



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

Departamento de Química

Tesis para acceder al título de Doctorado en Ciencias Químicas

ESTRUCTURAS MOLECULARES FORMADAS POR PORFIRINAS Y FULLERENO C₆₀ CON APLICACIONES EN LA INACTIVACIÓN FOTODINÁMICA DE MICROORGANISMOS

por

Lic. María Belén Ballatore

Director: Dr. Edgardo N. Durantini

Co-directora: Dra. M. Elisa Milanesio

Río Cuarto, Córdoba, Argentina

Diciembre de 2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales
Departamento de Química

Lic. María Belén Ballatore Firma..... Aclaración.....

Dr. Edgardo N. Durantini Firma..... Aclaración.....

Dra. M. Elisa Milanesio Firma..... Aclaración.....

COMISIÓN ASESORA y JURADO

Dra. Elba I. Buján Departamento de Química Orgánica. Facultad
de Ciencias Químicas.
Universidad Nacional de Córdoba.

Firma..... Aclaración.....

Dr. Mariano N. Correa Departamento de Química. Facultad de Cs.
Exactas Físico-Químicas y Naturales.
Universidad Nacional de Río Cuarto.

Firma..... Aclaración.....

Dr. Gabriel A. Planes Departamento de Química. Facultad de Cs.
Exactas Físico-Químicas y Naturales.
Universidad Nacional de Río Cuarto.

Firma..... Aclaración.....

DEFENSA ORAL y PÚBLICA

Lugar y Fecha:.....

Calificación:.....

.

A mis padres, Silvia y Carlos

A mi hermano, Matías

A mi tía lis, Adriana

A mi gran amor, Federico

*“Define el éxito en tus propios términos,
consíguelo por tus propias reglas y
construye una vida de la que estés orgullosa.”*

Anne Sweeney

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Silvia y Carlos, por apoyarme en todas las decisiones que tomo, por confiar en mí y por el inmenso amor que me han dado durante todos estos años. Al bombón que me cambió la vida desde el día que nació, mi hermano Matias. A mi querida Tía Lis, mi gran compañera incondicional. Muchas gracias por el diseño gráfico de esta tesis y todos sus anexos, quedaron increíbles. Al gran amor de mi vida, Federico, por agarrarme tan fuerte la mano e invitarme a recorrer juntos el complejo camino de la vida. A mi abuelo Role por haber compartido conmigo la pasión por la ciencia y acompañarme hasta sus últimos días. A mi abuela Susana por sus consejos y estar cuando la necesito. A mi prima Pauli por las locuras compartidas, las eternas charlas y los abrazos interminables. A Paca, por guiarme en mis primeros pasos en el conocimiento de las ciencias exactas. A toda mi familia de Córdoba, San Luis y Tucumán por su inmenso amor. A mis amigos por ser mi soporte, empuje y acompañamiento permanente.

A mis directores Elisa y Edgardo, por contribuir de forma decisiva en mi formación profesional, por sus consejos, tiempo, confianza, buen trato, paciencia y dedicación brindada a lo largo de todos estos años. Gracias por darme libertad para trabajar. A todos y cada uno de los miembros del PDI, a los que siguen y a los que ya no están, por su compañerismo, por sus consejos, aportes y por tantos momentos compartidos, académicos y otros no tanto.

A los integrantes del jurado, Elba, Mariano y Gabriel, por sus excelentes aportes y consejos brindados durante todo el desarrollo de esta tesis doctoral, por el tiempo y la predisposición ofrecidos en todo momento y por las hermosas devoluciones de cada defensa oral. Muchas gracias por acompañarme.

A la querida Universidad Nacional de Río Cuarto, porque durante estos 11 años me ha permitido formarme como profesional a través de una educación pública y de calidad. Quiero agradecer también a todos los integrantes del departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico Químicas y Naturales que han contribuido de alguna manera a mi formación. Gracias a todos los miembros del Súper Gran Becario por tan lindos momentos compartidos y por el compañerismo de todo los días.

A todos mis colegas con quienes tuve la posibilidad de compartir la docencia. No quiero dejar de agradecer a mis alumnos, tanto del ámbito científico-académico como de la danza, porque de ellos aprendí, aprendo y seguiré aprendiendo.

A CONICET por otorgarme la beca de posgrado, sin la cual no hubiera sido posible la realización de mi doctorado. A la Asociación Argentina de Investigación Fisicoquímica (AAIFQ), la Sociedad Argentina de Investigación en Química Orgánica (SAIQO) y a diferentes instituciones científicas, por el apoyo económico para poder asistir a los distintos eventos y reuniones científicas a lo largo de estos 5 años.

A mi país y a sus habitantes, por ser ellos los que me permitieron acceder a una educación de calidad. Espero, en el futuro y por el camino que me toque transitar, estar a entera disposición y poder retribuir todo lo brindado.

Finalmente, quiero agradecer a las personas que de alguna u otra forma contribuyeron al desarrollo de esta tesis y me ayudaron a llegar a esta instancia. No hubiese sido posible sin ustedes.

A todos, muchas gracias.

RESUMEN

El descubrimiento de los antibióticos planteó la creencia de que las enfermedades microbiológicas se reducirían gradualmente hasta un nivel en el que ya no tendrían un grave impacto en la salud humana. Sin embargo, en la actualidad el tratamiento de enfermedades infecciosas está siendo cada vez más cuestionado por los rápidos cambios evolutivos de los microorganismos, el gran número de patógenos encontrados y por la aparición continua de cepas resistentes a múltiples fármacos. Como consecuencia, ciertas infecciones que en el pasado podían ser tratadas fácilmente, hoy conducen a una mayor morbilidad y ponen en riesgo la vida de un paciente incluso en un ambiente hospitalario. En este sentido, la inactivación fotodinámica (PDI) podría brindar una solución a este problema. Así, en este trabajo de tesis se sintetizaron cuatro díadas porfirinas-fullereno C₆₀, TCP-C₆₀, TCP-C₆₀⁴⁺, TAP-C₆₀ y TAP-C₆₀⁴⁺ como fotosensibilizadores eficientes para la PDI. Los espectros de absorción mostraron una interacción débil entre los monómeros en el estado fundamental, donde la porfirina actúa como una antena atrapadora de energía. Mientras que la emisión de fluorescencia revela una desactivación del estado excitado de la porfirina por parte del fullereno C₆₀. Estudios de fotólisis en estado estacionario con un aceptor y un dador de electrones, indican que las díadas forman un estado de separación de carga fotoinducido en un solvente polar. Los resultados cinéticos con diferentes sustratos y distintos atrapadores de especies reactivas de oxígeno demuestran que las díadas actúan mediante un mecanismo de acción fotodinámico tipo I o II en función de la polaridad del microambiente donde se localizan. Estudios de PDI *in vitro* con la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* muestran que las díadas catiónicas producen una mayor inactivación. Para los cultivos tratados con 5 µM de TCP-C₆₀⁴⁺ y 30 min de irradiación, la eficiencia superó un 99,998% de inactivación. Por otro lado, se logró una erradicación completa de *S. aureus* incubada con 0,5 µM de TAP-C₆₀⁴⁺ y 5 min de irradiación. También se llevaron a cabo estudios con la bacteria Gram negativa *Escherichia coli*. Se encontró que TCP-C₆₀⁴⁺ fue poco efectiva, mientras que TAP-C₆₀⁴⁺ produjo una inactivación del 99,9999% para las células tratadas con 1 µM del fotosensibilizador y 15 min de irradiación. Por lo tanto, TAP-C₆₀⁴⁺ es una molécula muy efectiva para la PDI de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Por todas las ventajas que posee la PDI, es probable que en un futuro se convierta en una opción terapéutica convencional. Sin embargo, este tipo de tratamiento está en pleno desarrollo y aunque muchos fotosensibilizadores ya han sido evaluados *in vitro*, es necesario continuar con las investigaciones *in vivo* para que esta terapia llegue a las fases clínicas y luego al paciente.

Por otro lado, se busca el desarrollo de superficies con fotosensibilizadores inmovilizados, con el objetivo de alcanzar la esterilidad de distintas áreas. Esto se debe a que en los últimos tiempos, ha disminuido la susceptibilidad de diferentes microbios a los biocidas más comúnmente utilizados en los procesos de desinfección de superficies. Este hecho ha dado lugar a la generación de cepas microbianas resistentes a múltiples fármacos siendo las responsables de numerosas infecciones intrahospitalarias. Así, se construyeron diferentes películas sobre superficies mediante la deposición electroquímica de díadas y porfirinas sustituidas por grupos capaces de formar polímeros mediante voltametrías cíclicas. Se detectó que las mismas generan especies reactivas de oxígeno cuando son irradiadas con luz visible. Las superficies poliméricas resultaron eficientes para inactivar tanto *S. aureus* (99,97%) y *E. coli* (99,98%) en estado planctónico, como así también, biopelículas de *S. aureus* (99,97%). Por lo tanto, esta nueva tecnología podría ser empleada para la construcción de superficies asépticas.

ABSTRACT

The discovery of antibiotics throughout the years has reinforced the belief that microbiological diseases will be gradually reduced up to a level in which the latter will not have such a big effect on human beings' good health. Despite this, currently, the treatment of infectious diseases is being more and more questioned because of several causes like the rapid evolutive changes in microorganisms, the huge number of pathogens constantly found and the continuous appearance of strains resistant to multiple drugs. As a consequence, certain infections that could be easily treated in the past, are actually bringing about an increasing number of deaths and put patient's lives at risk even at hospitals and medical centers. In this sense, it is considered that PDI could bring a solution to this problem. In the present doctoral thesis, four porphyrin-fullerene C₆₀ dyads, TCP-C₆₀, TCP-C₆₀⁴⁺, TAP-C₆₀ and TAP-C₆₀⁴⁺, were synthesized as efficient photosensitizers for PDI. The absorption spectrum showed a weak interaction between the monomers in the ground state where porphyrin acts as an energy harvesting antenna. The emission of fluorescence reveals the quenching of the excited state of the porphyrin caused by the fullerene C₆₀. Steady-state photolysis studies with an acceptor and an electron donor, indicates that the dyads produce a charges separation photoinduced state in a polar solvent. Kinetic results with several substrates and different scavengers of reactive oxygen species indicate that the dyads can act through a photodynamic action mechanism type I or II, depending on the polarity of the microenvironment where they are located. PDI *in vitro* studies with the Gram positive *Staphylococcus aureus* bacterium showed that the cationic dyads produce a higher inactivation. Thus, a photoinactivation higher than 99.998% was found for cultivates treated with 5 µM TCP-C₆₀⁴⁺ and 30 min irradiation. On the other hand, a complete eradication of *S. aureus* was achieved by incubating the bacteria with 0.5 µM TAP-C₆₀⁴⁺ and irradiating it for 5 min. Also, studies were carried out using the Gram negative bacteria *Escherichia coli*. It was observed that TCP-C₆₀⁴⁺ was poorly effective, while TAP-C₆₀⁴⁺ was able to inactivate 99.999% of microorganisms using 1 µM photosensitizer and 15 min irradiation. We can conclude that TAP-C₆₀⁴⁺ is a promising photosensitizer for the PDI of both Gram positive and negative bacteria. Due to all the advantages PDI presents, it is probable that in a near future it may become a conventional therapeutic option. However, this kind of treatment is still being developed and even though many efficient photosensitizers have already been *in vitro* studied, it is necessary to carry on *in vivo* investigations before PDI reaches clinical phases.

These days, researchers are focused on developing surfaces containing photosensitizers with the aim of obtaining the sterility of different areas. This is due to the fact that in the last years, the susceptibility of different microbes has been reduced to the commonly used biocides for disinfecting surfaces. This fact has given birth to new microbial strains resistant to multiple drugs being them the responsible for numerous intrahospital infections. In this way, different surface films were constructed by the electrochemical deposition of dyes and porphyrins substituted by groups capable of forming polymers by cyclic voltammetry. It was noted that these films generate reactive oxygen species when they are irradiated with visible light. The polymeric surfaces turned out to be efficient to inactivate *S. aureus* (99.97%) and *E. coli* (99.98%) in their planktonic state and biofilms of *S. aureus* (99.97%). Therefore, it can be assumed that this new technology could definitely be employed for the construction of aseptic surfaces.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	xix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xxi
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	xxix
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	xxxv

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Inactivación fotodinámica	3
1.1.1. Origen de la inactivación fotodinámica	3
1.1.2. Resistencia microbiana	4
1.1.3. Infecciones intrahospitalarias	6
1.1.4. Fundamentos y condiciones óptimas para la PDI	10
1.1.5. Ventajas de la PDI	12
1.1.6. Mecanismos de fotosensibilización	13
1.1.7. Reacciones del oxígeno singlete.....	16
1.2. Bacterias	18
1.2.1. Gram positivas y Gram negativas.....	18
1.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	20
1.2.3. <i>Escherichia coli</i>	21
1.2.4. Biopelículas bacterianas.....	23
1.3. Fotosensibilizadores	26
1.3.1. Porfirinas	34
1.3.2. Fullerenos C ₆₀	54
1.3.3. Díadas porfirina-fullereno C ₆₀	64
1.4. Uso clínico de la PDI.....	66
1.5. Desinfección de aguas con PDI	69
1.5.1. Remoción del fotosensibilizador	69
1.5.2. La luz del sol como fuente de irradiación	73
1.5.3. Estabilidad de fotosensibilizadores a la irradiación	74
1.5.4. Derivados de porfirinas como fotosensibilizadores eficientes para PDI.....	75
1.5.5. Acción fotodinámica de superficies fotoinactivantes	76
1.5.6. Primeras superficies creadas para la desinfección de aguas	77
1.6. Desinfección de superficies con PDI.....	79

1.6.1. Primeras superficies creadas para esterilidad permanente	80
---	----

CAPÍTULO II

2. OBJETIVOS.....	87
2.1. Objetivos generales	87
2.2. Objetivos específicos	87

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	91
3.1. Equipamiento.....	91
3.2. Sistemas de irradiación	91
3.3. Reactivos y solventes	93
3.4. Fotosensibilizadores.....	93
3.5. Síntesis	94
3.5.1. <i>N</i> -Metil-2-(4-formilfenil)fulleropirrolidina (FC1)	94
3.5.2. <i>meso</i> -(<i>N</i> -Etil-3-carbazol)dipirrometano (DPM1)	94
3.5.3. Díada TCP-C ₆₀ . Metodología I	95
3.5.4. 4-(4,4-Dimetil-2,6-dioxan-1-il)benzaldehído	95
3.5.5. 5-(4-(5,5-Dimetil-1,3-dioxan-2-il)fenil)-10,15,20-tris[3-(<i>N</i> -etilcarbazol)]porfirina (P1)	95
3.5.6. 5-(4-Carbonilfenil)-10,15,20-tris[3-(<i>N</i> -etilcarbazol)]porfirina (P2)	96
3.5.7. Díada TCP-C ₆₀ . Metodología II.....	97
3.5.8. Díada TCP-C ₆₀ ⁴⁺	97
3.5.9. Díada ZnTCP-C ₆₀	98
3.5.10. <i>meso</i> -[4-(3- <i>N,N</i> -Dimetilamino)propoxil]dipirrometano (DPM2).....	98
3.5.11. 5-(4-(5,5-Dimetil-1,3-dioxan-2-il)fenil)-10,15,20-tris[4-(3- <i>N,N</i> -dimetilamino)propoxil]porfirina (P3).....	98
3.5.12. 5-(4-Carbonilfenil)-10,15,20-tris[4-(3- <i>N,N</i> -dimetilamino)propoxil]porfirina (P4).....	99
3.5.13. Díada TAP-C ₆₀	100
3.5.14. Díada TAP-C ₆₀ ⁴⁺	100
3.5.15. 5,10,15,20-Tetrakis[3-(<i>N</i> -etilcarbazol)]porfirina (TCP)	100
3.5.16. Zn(II) 5,10,15,20-Tetrakis[3-(<i>N</i> -etilcarbazol)]porfirina (ZnTCP).....	101
3.6. Experimentos electroquímicos	101
3.7. Preparación de soluciones <i>stock</i> de los fotosensibilizadores	102

3.8. Estudios espectroscópicos	102
3.9. Estudios en medios homogéneos. Fotólisis en estado estacionario	103
3.9.1. Reducción de metil viológeno por TCP-C ₆₀ y TCP-C ₆₀ ⁴⁺	103
3.9.2. Fotooxidación de 9,10-dimetilantraceno	103
3.9.3. Reacción de los fotosensibilizadores con azul de nitrotetrazolio	104
3.9.4. Fotooxidación de L-triptófano	104
3.10. Estudios en medios microheterogéneos.....	106
3.10.1. Estudios en micelas inversas de AOT.....	106
3.11. Estudios con películas poliméricas. Fotólisis en estado estacionario	107
3.11.1. Fotooxidación de 2,2'-(antraceno-9,10-diil)bis(metilmalonato) de sodio	107
3.11.2. Reacción de los polímeros antibacterianos con azul de nitrotetrazolio	107
3.11.3. Fotooxidación de L-triptófano.....	107
3.12. Estudios con microorganismos	108
3.13. PDI de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> con fotosensibilizadores disueltos en solución	109
3.13.1. Inactivación fotodinámica de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> . Metodología I	109
3.13.2. Inactivación fotodinámica de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> . Metodología II	110
3.14. Inactivación de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> empleando superficies electropolimerizadas. 110	
3.14.1. Inactivación de <i>S. aureus</i> . Metodología I	110
3.14.2. Inactivación de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> . Metodología II	110
3.14.3. PDI de biopelículas de <i>S. aureus</i> creciendo sobre superficies electropolimerizadas.....	111
3.15. Mecanismo de acción fotodinámica <i>in vitro</i>	111
3.16. Cálculo de porcentajes de inactivación de microorganismos	112
3.17. Experimentos control y análisis estadísticos.....	112

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	119
4.1. Síntesis de las díadas porfirina-fullereno C ₆₀ (TCP-C ₆₀ y TCP-C ₆₀ ⁴⁺)	119
4.2. Propiedades espectroscópicas de absorción y de fluorescencia.....	125
4.3. Fotólisis en estado estacionario en presencia de un aceptor y un dador de electrones.....	130
4.4. Fotooxidación de DMA	133
4.5. Solubilidad y actividad fotodinámica de las díadas en micelas inversas de AOT ..	136
4.6. Determinación de O ₂ ^{•-} con NBT.....	140
4.7. Fotooxidación de Trp	142

4.7.1. Fotooxidación de Trp en presencia de β -caroteno	145
4.7.2. Fotooxidación de Trp en presencia del ion azida.....	147
4.8. Fotoinactivación de <i>S. aureus</i>	151
4.9. Mecanismo de acción fotodinámica <i>in vitro</i>	154
4.9.1. PDI en una atmósfera anóxica	155
4.9.2. PDI de suspensiones celulares en D ₂ O.....	156
4.9.3. Efecto del ion azida en la PDI	156
4.9.4. Efecto del manitol en la PDI.....	157
4.10. Fotooxidación de DMA en células de <i>S. aureus</i>	158
4.11. Diseño de una nueva díada porfirina-fullereno C ₆₀	160
4.12. Síntesis de díadas porfirina-fullereno C ₆₀ (TAP-C ₆₀ y TAP-C ₆₀ ⁴⁺).....	160
4.13. Propiedades espectroscópicas de absorción y de fluorescencia	164
4.14. Fotooxidación de DMA.....	167
4.15. Fotooxidación de Trp	169
4.16. Inactivación de <i>S. aureus</i> fotosensibilizada por díadas.....	169
4.17. Inactivación de <i>E. coli</i> fotosensibilizada por díadas.....	173
4.18. Mecanismo de acción fotodinámica <i>in vitro</i>	176
4.18.1. PDI en una atmósfera anóxica	176
4.18.2. PDI de suspensiones celulares en D ₂ O.....	177
4.18.3. Efecto del ion azida en la PDI	178
4.18.4. Efecto del manitol en la PDI.....	179
4.19. Obtención de polímeros antibacterianos	183
4.19.1. Experimentos electroquímicos.....	183
4.20. Propiedades espectroscópicas.....	189
4.20.1. Propiedades espectroscópicas de los polímeros electroquímicos	189
4.21. Fotólisis en estado estacionario	192
4.21.1. Fotooxidación de ABMM.....	192
4.21.2. Reacción con azul de nitrotetrazolio	195
4.21.3. Fotooxidación de L-triptófano	197
4.22. Estudios con microorganismos	199
4.22.1. Inactivación de <i>S. aureus</i> sobre superficies electropolimerizadas	199
4.22.2. Inactivación de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> con superficies antimicrobianas	202
4.23. Reutilización de superficies poliméricas para la PDI de bacterias	205
4.24. Una nueva visión para la construcción de superficies antimicrobianas	206
4.25. Obtención de nuevos polímeros antibacterianos	207

4.26. Propiedades espectroscópicas	211
4.26.1. Propiedades espectroscópicas de los nuevos fotosensibilizadores.....	211
4.26.2. Propiedades espectroscópicas de las nuevas películas poliméricas	216
4.27. Fotólisis en estado estacionario.....	217
4.27.1. Fotooxidación de DMA	217
4.27.2. Fotooxidación de ABMM	220
4.28. Inactivación de biopelículas de <i>S. aureus</i> creciendo sobre superficies	221
4.28.1. Ensayos de PDI de biopelículas de <i>S. aureus</i>	221
4.28.2. Imágenes al microscopio de la PDI de biopelículas de <i>S. aureus</i>	225
4.28.3. Reutilización de polímeros para la PDI de biopelículas de <i>S. aureus</i>	228

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES	233
-----------------------	-----

CAPÍTULO VI

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	241
------------------------------------	-----

CAPÍTULO VII

7. ANEXO. BORODIPIRROMETENOS (BODIPYS)	291
--	-----

CAPÍTULO VIII

8. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	313
8.1. Publicaciones	313
8.2. Patente	314
8.3. Congresos, Simposios, Reuniones y Encuentros	314
8.3.1. Modalidad Ponencia Oral	314
8.3.2. Modalidad Poster.....	314
8.4. Premios	316
8.5. Becas de Posgrado.....	317

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Condiciones óptimas para producir inactivación fotodinámica ocasionando un daño mínimo en las células huésped.	12
Tabla N°2. Propiedades espectroscópicas de los fotosensibilizadores en distintos medios.	129
Tabla N°3. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de DMA (k_{obs}) y rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) en diferentes medios. ...	136
Tabla N°4. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de DMA (k_{obs}^{AOT}) y rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) en micelas inversas de AOT.	138
Tabla N°5. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de Trp (k_{obs}^{Trp}).....	144
Tabla N°6. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de DMA (k_{obs}^{DMA}) y Trp (k_{obs}^{Trp}), y rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete (Φ_{Δ}).....	168
Tabla N°7. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de ABMM (k_{obs}^{ABMM}) en agua.	194
Tabla N°8. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de Trp (k_{obs}^{Trp}) en agua.	198
Tabla N°9. Propiedades espectroscópicas de los fotosensibilizadores en distintos medios.	214
Tabla N°10. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de DMA (k_{obs}^{DMA}) en DMF y tolueno.....	219
Tabla N°11. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de ABMM (k_{obs}^{ABMM}) en agua.	221
Tabla N°12. Resultados de la reutilización de las superficies poliméricas ZnCBZTPA y ZnCBZTPA/CBZTPA para la PDI de biopelículas de <i>S. aureus</i> ($\sim 1 \times 10^8$ UFC/ml). $\lambda_{irr} = 350-800$ nm.	229

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1. Cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923. (A) Cultivo en caldo tripticasa soya después de un crecimiento durante toda la noche (<i>Overnight</i> , ON). (B) Colonias circulares características de <i>S. aureus</i> creciendo sobre placa de agar tripticasa soya. (C) Imagen al microscopio óptico de <i>S. aureus</i> , 100x.	20
Figura N°2. Cepa de <i>E. coli</i> EC7. (A) Cultivo en caldo tripticasa soya después de un crecimiento durante toda la noche (<i>Overnight</i> , ON). (B) Colonias características de <i>E. coli</i> creciendo sobre placa de agar tripticasa soya. (C) Imagen al microscopio óptico de <i>E. coli</i> , 100x.....	22
Figura N°3. Microscopía electrónica de barrido de biopelículas de <i>S. aureus</i> creciendo sobre vidrios dopados con óxido de indio y estaño.....	24
Figura N°4. Espectros de absorción de cromóforos biológicos presentes en el cuerpo humano.	27
Figura N°5. (A) Espectro de absorción característico de tetrafenilporfirinas de base libre. (B) Espectro de absorción de porfirinas que forman complejos metálicos.	51
Figura N°6. (A) Espectro de emisión de fluorescencia característico de porfirinas. (B) Espectro de excitación de una porfirina base libre que muestra las bandas <i>Q</i> características de estos compuestos.	52
Figura N°7. Espectro de absorción de fullereno C ₆₀ en DMF.....	61
Figura N°8. Espectro de absorción de DTC ₆₀ ²⁺ en DMF.....	62
Figura N°9. Espectro de emisión de DTC ₆₀ ²⁺ en DMF.....	63
Figura N°10. Dispositivo PPA Lux 680 empleado para la irradiación de la zona infectada tratada con PPA904.....	67
Figura N°11. HELBO® <i>Professional-Set Plus</i>	68
Figura N°12. Energía de la radiación solar en la superficie del mar.	74
Figura N°13. Fotografías de las películas de plástico de polisilsesquioxano sin dopar con el fotosensibilizador (A) y dopadas con 550 µl (B) y con 1100 µl (C) de una solución stock de porfirina 4x10 ⁻⁴ M en tetrahidrofurano.	83
Figura N°14. Purificación de la porfirina P3 mediante cromatografía en columna <i>flash</i> (Silica gel, DCM/MeOH gradiente 0-20%/TEA gradiente 1-3%).	99
Figura N°15. Celda de tres electrodos y potenciostato/galvanostato PalmSens, empleados para los experimentos electroquímicos de obtención de superficies.	101
Figura N°16. Curvas de crecimiento en CTS a 37°C de (A) <i>S. aureus</i> y (B) <i>E. coli</i>	108

Figura N°17. Espectros de absorción UV-visible de díada TCP-C ₆₀ (línea continua), TCP (línea discontinua) y MAC ₆₀ (línea de puntos) (A) en tolueno y (B) en DMF. Inserto en (A) Espectro de absorción de TCP-C ₆₀ , banda característica del fullereno C ₆₀	126
Figura N°18. Espectros de absorción UV-visible de TCP-C ₆₀ ⁴⁺ (línea continua), TCP ⁴⁺ (línea discontinua) y DAC ₆₀ ⁺ (línea de puntos) en DMF.	126
Figura N°19. Espectros de absorción UV-visible. (A) TCP-C ₆₀ en tolueno (línea continua) y en micelas inversas de AOT (línea discontinua). (B) TCP-C ₆₀ ⁴⁺ en tolueno (línea continua) y en micelas inversas de AOT (línea discontinua).	127
Figura N°20. Espectros de emisión de fluorescencia en DMF de (A) TCP-C ₆₀ (línea continua) y TCP (línea discontinua) y, (B) TCP-C ₆₀ ⁴⁺ (línea continua) y TCP ⁴⁺ (línea discontinua). $\lambda_{exc}=550$ nm.	128
Figura N°21. Cambios en el espectro de absorción de la díada TCP-C ₆₀ + MV ²⁺ +NADH en DMF-agua (5%). $\lambda_{irr}=433\pm5$ nm.	131
Figura N°22. Cambios en el espectro de absorción de las díadas (A) TCP-C ₆₀ y (B) TCP-C ₆₀ ⁴⁺ , disueltas en una solución de DMF-agua (5%) con MV ²⁺ y TMN, al ser irradiadas con luz visible.	132
Figura N°23. Fotooxidación del DMA fotosensibilizada por TCP-C ₆₀ cada 2 min de irradiación ($\lambda_{irr}=428\pm5$ nm) en tolueno.	134
Figura N°24. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de DMA (35 μ M) fotosensibilizada por TCP-C ₆₀ (▼), TCP-C ₆₀ ⁴⁺ (▲), TCP (■) y TMP (●) en (A) tolueno y (B) DMF; $\lambda_{irr}=428\pm5$ nm.	135
Figura N°25. Variación de la intensidad de emisión de fluorescencia como una función de la [AOT] en micelas inversas de tolueno/AOT (0,1 M)/agua ($W_0 = 10$) de (A) TCP-C ₆₀ ($\lambda_{m\acute{a}x}=665$ nm) y B) TCP-C ₆₀ ⁴⁺ ($\lambda_{m\acute{a}x} = 664$ nm), $\lambda_{exc}=432$ nm. Línea discontinua: ajuste no lineal con la Ecuación N°12. Gráficos insertados: espectros de emisión de fluorescencia de (A) TCP-C ₆₀ y (B) TCP-C ₆₀ ⁴⁺ a diferentes concentraciones de AOT (0,25-37,0 mM). ...	137
Figura N°26. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de DMA (35 μ M) fotosensibilizada por TCP-C ₆₀ (▼), TCP-C ₆₀ ⁴⁺ (▲) y TCP (■) en tolueno/AOT (0,1 M)/agua ($W_0 = 10$); $\lambda_{irr}=428\pm5$ nm.	139
Figura N°27. (A) Aumento de la absorbancia a medida que transcurre el tiempo de irradiación debido a la aparición del producto diformazán. TCP + NBT + NADH en DMF. (B) Detección de O ₂ ^{•-} mediante la reacción con NBT a diferentes tiempos de irradiación con luz monocromática. NBT + NADH (▼), TCP + NBT + NADH (■), TCP-C ₆₀ + NBT + NADH (●) y TCP-C ₆₀ ⁴⁺ + NBT + NADH (▲). Estudios en DMF a $\lambda_{irr}=428\pm5$ nm.	142
Figura N°28. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de Trp (20 μ M) fotosensibilizada por TCP (●), TCP-C ₆₀ ⁴⁺ (■) y TCP-C ₆₀ (▲) en DMF ($\lambda_{irr}=428\pm5$ nm).	143
Figura N°29. Espectro de absorción de β -caroteno y TCP en DMF.	145

Figura N°30. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de Trp (20 μ M) fotosensibilizada por (A) TCP + β -caroteno (■) y TCP (●) (B) TCP-C₆₀ + β -caroteno (■) y TCP-C₆₀ (●) (C) TCP-C₆₀⁴⁺ + β -caroteno (■) y TCP-C₆₀⁴⁺ (●) (λ_{irr} =562 \pm 5 nm) en DMF. .147

Figura N°31. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de Trp (20 μ M) fotosensibilizada por: (A) TCP + azida (■) y TCP (●) (B) TCP-C₆₀ + azida (■) y TCP-C₆₀ (●) (C) TCP-C₆₀⁴⁺ + azida (■) y TCP-C₆₀⁴⁺ (●) (λ_{irr} =562 \pm 5 nm) en DMF 149

Figura N°32. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de Trp (20 μ M) fotosensibilizada por (A) TCP + D-manitol (■) y TCP (●) (B) TCP-C₆₀ + D-manitol (■) y TCP-C₆₀ (●) (C) TCP-C₆₀⁴⁺ + D-manitol (■) y TCP-C₆₀⁴⁺ (●) (λ_{irr} =562 \pm 5 nm) en DMF. .150

Figura N°33. Supervivencia de *S. aureus* ($\sim 10^6$ UFC/ml) incubadas con: 1 μ M TCP-C₆₀ (◄), 5 μ M TCP-C₆₀ (▼), 1 μ M TCP-C₆₀⁴⁺ (►) y 5 μ M TCP-C₆₀⁴⁺ (▲) durante 30 min a 37 °C en la oscuridad y expuestas a la luz visible durante diferentes tiempos de irradiación. Controles: células tratadas con 5 μ M TCP-C₆₀ (▽) y TCP-C₆₀⁴⁺ (Δ) en la oscuridad; células sin fotosensibilizador e irradiadas (●) (**p* < 0,05, comparado con TCP-C₆₀). 152

Figura N°34. Supervivencia de *S. aureus* ($\sim 10^6$ UFC/ml) incubada con 1 μ M DAC₆₀⁺ (▼), TCP⁴⁺ (■) and TCP-C₆₀⁴⁺ (▲) durante 30 min a 37 °C en la oscuridad e irradiadas con luz visible durante diferentes tiempos. Controles: células tratadas con 1 μ M DAC₆₀⁺ (▽), TCP⁴⁺ (□) y TCP-C₆₀⁴⁺ (Δ) en la oscuridad; células sin fotosensibilizador e irradiadas (●) (**p* < 0,05, comparado con DAC₆₀⁺ o TCP⁴⁺). 153

Figura N°35. Sobrevivencia de *S. aureus* ($\sim 10^6$ UFC/ml) incubadas con 1 μ M de TCP-C₆₀ en la oscuridad durante 30 min a 37°C y posterior irradiación con luz visible durante 15 min. (1) control oscuridad; (2) control irradiado; (3) control oscuridad con TCP-C₆₀; (4) células tratadas con TCP-C₆₀ e irradiadas; (5) control en atmósfera de argón; (6) células tratadas con TCP-C₆₀ e irradiadas en atmósfera de argón; (7) control de D₂O; (8) suspensión celular en D₂O tratada con TCP-C₆₀ e irradiada; (9) Control con 50 mM de NaN₃; (10) suspensión celular con NaN₃ tratada con TCP-C₆₀ e irradiada; (11) Control con 50 mM de manitol; (12) suspensión celular con manitol tratada con TCP-C₆₀ e irradiada. 155

Figura N°36. Sobrevivencia de *S. aureus* ($\sim 10^6$ UFC/ml) incubadas con 1 μ M de TCP-C₆₀⁴⁺ en la oscuridad durante 30 min a 37°C y posterior irradiación con luz visible durante 15 min. (1) control oscuridad; (2) control irradiado; (3) control oscuridad con TCP-C₆₀⁴⁺; (4) células tratadas con TCP-C₆₀⁴⁺ e irradiadas; (5) control en atmósfera de argón; (6) células tratadas con TCP-C₆₀⁴⁺ e irradiadas en atmósfera de argón; (7) control de D₂O; (8) suspensión celular en D₂O tratada con TCP-C₆₀⁴⁺ e irradiada; (9) Control con 50 mM de NaN₃; (10) suspensión celular con NaN₃ tratada con TCP-C₆₀⁴⁺ e irradiada; (11) Control con 50 mM de manitol; (12) suspensión celular con manitol tratada con TCP-C₆₀⁴⁺ e irradiada. 157

Figura N°37. (A) Espectros de emisión de fluorescencia que muestran los cambios en la fotooxidación de DMA en células de *S. aureus* mediada por TCP-C₆₀ luego de diferentes tiempos de irradiación. (B) Fotooxidación de DMA en células de *S. aureus* ($\sim 10^6$ CFU/ml) incubadas con 10 μ M de DMA durante 30 min y tratadas con los fotosensibilizadores TCP-C₆₀ (●) y TCP-C₆₀⁴⁺ (▲) en concentraciones de 1 μ M (λ_{irr} = 455-800 nm). Control: células de *S. aureus* con DMA (■). λ_{irr} = 455-800 nm. 159

- Figura N°38. (A) Espectros de absorción de la díada TAP-C₆₀ en solventes de distinta polaridad. (B) Espectro de absorción de TAP-C₆₀ (línea continua) y TAP-C₆₀⁴⁺ (línea de rayas) en DMF..... 165
- Figura N°39. Espectros de emisión de fluorescencia de TMP (línea de puntos), TAP-C₆₀ (línea continua) y TAP-C₆₀⁴⁺ (línea de rayas) en DMF. $\lambda_{exc}=420$ nm. 166
- Figura N°40. Espectro de excitación de fluorescencia de TCP-C₆₀ en DMF ($\lambda_{emi}= 720$ nm). 167
- Figura N°41. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de DMA (35 μ M) fotosensibilizada por la porfirina TMP (●) y, las díadas TAP-C₆₀ (▲) y TAP-C₆₀⁴⁺ (▼) en (A) DMF y (B) DMF/tolueno (1:1) ($A^{Soret} = 0,1$; $\lambda_{irr}=422\pm5$ nm). 168
- Figura N°42. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de Trp (35 μ M) fotosensibilizada por la porfirina TMP (●) y las díadas TAP-C₆₀ (▲) y TAP-C₆₀⁴⁺ (▼) en DMF ($A^{Soret} = 0,1$; $\lambda_{irr}=422\pm5$ nm). 169
- Figura N°43. Supervivencia de *S. aureus* ($\sim 10^8$ UFC/ml) incubadas con (A) 1 μ M y (B) 5 μ M de: TCP-C₆₀ (●), TMP-C₆₀ (▼) y TAP-C₆₀ (▲) durante 30 min a 37 °C en la oscuridad y expuestas a la luz visible durante diferentes tiempos de irradiación. Control (■)..... 171
- Figura N°44. Supervivencia de *S. aureus* ($\sim 10^8$ UFC/ml) incubadas con 1 μ M de: TCP-C₆₀⁴⁺ (●) TAP-C₆₀ (▲) y TAP-C₆₀⁴⁺ (▼) durante 30 min a 37 °C en la oscuridad y expuestas a la luz visible durante diferentes tiempos de irradiación. Control (■). 172
- Figura N°45. Supervivencia de *E. coli* ($\sim 10^8$ UFC/ml) incubadas con 1 μ M de: TCP-C₆₀⁴⁺ (●) TAP-C₆₀ (▲) y TAP-C₆₀⁴⁺ (▼) durante 30 min a 37 °C en la oscuridad y expuestas a la luz visible durante diferentes tiempos de irradiación. Control (■)..... 174
- Figura N°46. Supervivencia de *S. aureus* ($\sim 10^6$ UFC/ml) incubadas con 1 μ M de TAP-C₆₀ en la oscuridad durante 30 min a 37°C y posterior irradiación con luz visible durante 15 min. (1) control oscuridad; (2) control irradiado; (3) control oscuridad con TCP-C₆₀; (4) células tratadas con TCP-C₆₀ e irradiadas; (5) control en atmósfera de argón; (6) células tratadas con TCP-C₆₀ e irradiadas en atmósfera de argón; (7) Control con 50 mM de NaN₃; (8) suspensión celular con NaN₃ tratada con TCP-C₆₀ e irradiada; (9) control de D₂O; (10) suspensión celular en D₂O tratada con TCP-C₆₀ e irradiada; (11) Control con 50 mM de manitol; (12) suspensión celular con manitol tratada con TCP-C₆₀ e irradiada. 177
- Figura N°47. Supervivencia de *S. aureus* ($\sim 10^6$ UFC/ml) incubadas con 0,5 μ M de TAP-C₆₀⁴⁺ en la oscuridad durante 30 min a 37°C y posterior irradiación con luz visible durante 5 min. (1) control oscuridad; (2) control irradiado; (3) control oscuridad con TCP-C₆₀; (4) células tratadas con TCP-C₆₀ e irradiadas; (5) control en atmósfera de argón; (6) células tratadas con TCP-C₆₀ e irradiadas en atmósfera de argón; (7) Control con 50 mM de NaN₃; (8) suspensión celular con NaN₃ tratada con TCP-C₆₀ e irradiada; (9) control de D₂O; (10) suspensión celular en D₂O tratada con TCP-C₆₀ e irradiada; (11) Control con 50 mM de manitol; (12) suspensión celular con manitol tratada con TCP-C₆₀ e irradiada. 178

- Figura N°48. (A) Primer barrido anódico y catódico de TCP-C₆₀ a diferentes potenciales de inversión y (B) diez ciclos de VC tomados en *o*-DCB con TBAP como electrolito soporte utilizando Pt como electrodo de trabajo. La línea roja muestra la primera capa luego de la deposición con Pt como electrodo de trabajo. Todas las VC se obtuvieron con una velocidad de barrido de 100 mV/s. 184
- Figura N°49. (A) ITO antes de la electropolimerización. (B) ITO con la bicapa ZnTCP/TCP electrodepositada. 185
- Figura N°50. VC obtenidos como respuesta de las bicapas electropolimerizadas de (A) TCP/TCP-C₆₀, y (B) TCP/ZnTCP en DCE sólo con el electrolito soporte. Las líneas rojas corresponden a la VC luego de la deposición de la primera capa, y las líneas negras luego de la deposición de la segunda capa. Electrodo de trabajo de Pt. Todas las VC se obtuvieron con una velocidad de barrido de 100 mV/s. 188
- Figura N°51. Espectros de absorción UV-visible de TCP-C₆₀ (línea sólida), TCP (línea de puntos) y ZnTCP (línea punteada) en DMF. 190
- Figura N°52. Espectros de absorción UV-visible de los polímeros TCP-C₆₀ (línea continua), TCP/TCP-C₆₀ (línea discontinua) y TCP/ZnTCP (línea de puntos) corregidos por la absorción del electrodo transparente de óxido de indio y estaño (ITO). 191
- Figura N°53. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de ABMM (35 µM) fotosensibilizada por los polímeros de TCP-C₆₀ (▲), TCP/TCP-C₆₀ (◄) y TCP/ZnTCP (▼) depositados sobre ITO y electrodo de ITO (■) en agua ($A^{Soret} = 0,1$, $\lambda_{irr} = 455-800$ nm). 193
- Figura N°54. (A) Aumento de la absorbancia a medida que transcurre el tiempo de irradiación debido a la aparición del producto DF. TCP-C₆₀ poli + NBT + NADH en DMF. (B) Detección de O₂^{•-} mediante la reacción con NBT a diferentes tiempos de irradiación. Polímeros de TCP-C₆₀ (▲), TCP/TCP-C₆₀ (◄) y TCP/ZnTCP (▼) sobre ITO, electrodo de ITO (■) y TPPS⁴⁻ (◆) en agua. ($A^{Soret} = 0,1$ - $\lambda_{irr} = 455-800$ nm). Control: NBT and NADH (●). 196
- Figura N°55. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de Trp (20 µM) fotosensibilizada por los polímeros de TCP-C₆₀ (▲), TCP/TCP-C₆₀ (◄) y TCP/ZnTCP (▼) sobre ITO, electrodo de ITO (■) y TPPS⁴⁻ (◆) en agua ($A^{Soret} = 0,1$; $\lambda_{irr} = 455-800$ nm). 197
- Figura N°56. Supervivencia de *S. aureus* (~10⁴ UFC/ml) depositando una gota (250 µl) con las células sobre los polímeros de TCP-C₆₀ (▲), TCP/TCP-C₆₀ (◄) y TCP/ZnTCP ($A^{Soret} = 0,3$) (▼) sobre ITO y el electrodo de ITO (■). Las células se expusieron a la luz visible durante diferentes tiempos de irradiación. Control: células irradiadas sobre el ITO sin polímero (●) (**p* < 0,05, comparado con el control). 201
- Figura N°57. Supervivencia de *S. aureus* (~10⁴ UFC/ml) en PBS fotosensibilizada por los polímeros TCP-C₆₀ (▲), TCP/TCP-C₆₀ (◄), TCP/ZnTCP (▼) y TCP/ZnTCP ($A^{Soret} = 0,8$) (▽) sobre ITO y el electrodo de ITO solo (■). Las células se expusieron a la luz visible durante diferentes tiempos de irradiación. En todos los casos, la $A^{Soret} = 0,1$ excepto cuando

se indica lo contrario. Control: células irradiadas sobre el ITO sin polímero (●) (* $p < 0.05$, comparado con el control).	203
Figura N°58. Supervivencia de <i>E. coli</i> ($\sim 10^4$ UFC/ml) en PBS fotosensibilizada por el polímero TCP-C ₆₀ ($A^{Soret} = 0,1$) (▲) sobre ITO y el electrodo de ITO (■). Las células se expusieron a la luz visible durante diferentes tiempos de irradiación. Control: células irradiadas sobre el ITO sin polímero (●) (* $p < 0,05$, comparado con el control).	204
Figura N°59. Fotoblanqueo de la superficie polimérica TCP-C ₆₀ en solución de PBS con <i>S. aureus</i> ($\sim 1 \times 10^4$ UFC/ml). $\lambda_{irr} = 455-800$ nm.	205
Figura N°60. Resultados de la reutilización de la superficie polimérica TCP-C ₆₀ para la PDI de <i>S. aureus</i> ($\sim 1 \times 10^4$ UFC/ml) empleando la metodología I. $\lambda_{irr} = 350-800$ nm.	206
Figura N°61. (A) Primer barrido anódico y catódico de ZnTCP-C ₆₀ . (B) Diez ciclos de VC tomados en <i>o</i> -DCB con TBAP como electrolito soporte utilizando Pt como electrodo de trabajo. Todas las VC se obtuvieron con una velocidad de barrido de 100 mV/s.	208
Figura N°62. VC obtenidos como respuesta de las bicapas electropolimerizadas de ZnCBZTPA/CBZTPA en DCE sólo con el electrolito soporte. La línea negra corresponde a la VC luego de la deposición de la primera capa, y la línea roja luego de la deposición de la segunda capa. Electrodo de trabajo de Pt. Todas las VC se obtuvieron con una velocidad de barrido de 100 mV/s.	209
Figura N°63. Espectros de absorción UV-visible de: (A) CBZTPA (línea sólida) y ZnCBZTPA (línea de rayas); (B) TCP-C ₆₀ (línea sólida) y ZnTCP-C ₆₀ (línea de rayas) en tolueno.	212
Figura N°64. Espectros de absorción UV-visible de: (A) CBZTPA (línea sólida) y ZnCBZTPA (línea de rayas); (B) TCP-C ₆₀ (línea sólida) y ZnTCP-C ₆₀ (línea de rayas) en DMF.	212
Figura N°65. Espectros de emisión de fluorescencia de CBZTPA (línea continua) y ZnCBZTPA (línea de rayas) en (A) tolueno y (B) DMF; $\lambda_{exc}=550$ nm.	213
Figura N°66. Espectros de emisión de fluorescencia de ZnTCP-C ₆₀ en (A) tolueno y (B) DMF. $\lambda_{exc}=430$ nm (línea continua); $\lambda_{exc}=550$ nm (línea de rayas).	215
Figura N°67. Espectros de absorción UV-visible de los polímeros ZnTCP-C ₆₀ (línea continua), ZnCBZTPA (línea de rayas) y ZnCBZTPA/CBZTPA (línea de puntos) corregidos por la absorción del electrodo transparente de óxido de indio y estaño (ITO).	216
Figura N°68. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de DMA (35 μ M) fotosensibilizada por las porfirinas ZnCBZTPA (▲), TCP-C ₆₀ (◆), CBZTPA (▼), TCP (■) y ZnTCP-C ₆₀ (●) en (A) tolueno y (B) DMF ($A^{Soret} = 0,1$; $\lambda_{irr}=430$ nm).	218
Figura N°69. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de ABMM (35 μ M) fotosensibilizada por las superficies: ZnTCP-C ₆₀ (●), ZnCBZTPA (▲) y	

ZnCBZTPA/CBZTPA (▼) depositados sobre ITO, electrodo de ITO (■) y en agua ($A^{Soret} = 0,1$, $\lambda_{irr} = 455-800$ nm).220

Figura N°70. Supervivencia de biopelículas de *S. aureus* ($\sim 10^8$ UFC/ml) creciendo sobre los polímeros de ZnCBZTPA ($A^{Soret} = 0,1$) (■), ZnCBZTPA/CBZTPA ($A^{Soret} = 0,1$) (●), ZnTCP-C₆₀ ($A^{Soret} = 0,1$) (▲), TCP-C₆₀ ($A^{Soret} = 0,1$) (▼) y el electrodo de ITO sin polímero antibacteriano (□).223

Figura N°71. Supervivencia de biopelículas de *S. aureus* ($\sim 10^8$ UFC/ml) creciendo sobre los polímeros de ZnCBZTPA ($A^{Soret} = 0,1$) (▼), ZnCBZTPA ($A^{Soret} = 0,4$) (●), ZnCBZTPA ($A^{Soret} = 0,7$) (▲) y el electrodo de ITO sin polímero antibacteriano (□).224

Figura N°72. Microscopia confocal de biopelículas de *S. aureus* creciendo en la superficie ZnCBZTPA ($A^{Soret} \sim 0,8$) (A) antes de ser irradiada y (B) luego de 60 min de irradiación con luz visible.225

Figura N°73. (A) Imágenes SEM del polímero de ZnCBZTPA ($A^{Soret} \sim 0,8$). (B) Biopelícula de *S. aureus* creciendo sobre el polímero ZnCBZTPA en la oscuridad. (C) Biopelícula de *S. aureus* sobre el polímero de ZnCBZTPA luego de ser expuesto a la luz visible durante 60 min.226

Figura N°74. Imágenes de las superficies microporosas con forma de panal de abejas tomadas con el microscopio electrónico de barrido (SEM). (A) Antes de la irradiación. (B) luego de 1 hora de irradiación con luz visible en solución de PBS.229

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema N°1. (A) Fotografía de <i>Paramecium caudatum</i> . (B) Estructura de la molécula naranja de acridina.	3
Esquema N°2. Resistencia de las bacterias a los antibióticos. Adaptado de referencia 19....	6
Esquema N°3. Etapas de la inactivación fotodinámica para el tratamiento de tejidos infectados.....	11
Esquema N°4. Diagrama de Jablonski modificado para un fotosensibilizador.	14
Esquema N°5. Mecanismos de acción fotodinámica tipo I y tipo II.	15
Esquema N°6. Peroxidación del ácido linoleico mediada por $O_2(^1\Delta_g)$	17
Esquema N°7. Mecanismo de fotooxidación de guanina.....	17
Esquema N°8. Membrana y pared celular de (A) bacterias Gram positivas y (B) Gram negativas.....	18
Esquema N°9. Estructura molecular de: (A) hematoporfirina, (B) clorofila y (C) bacterioclorofila.	26
Esquema N°10. Estructuras moleculares de los fotosensibilizadores empleados para la PDI.	29
Esquema N°11. Penetración de la luz en los tejidos.....	30
Esquema N°12. Posibles geometrías de agregados de porfirinas.	31
Esquema N°13. Diferentes localizaciones del fotosensibilizador en las células microbianas.	33
Esquema N°14. (A) Estructura molecular del macrociclo tetrapirrólico de porfirinas. (B) Imágenes en tres dimensiones (3D) del anillo central.	36
Esquema N°15. Posiciones <i>meso</i> y β sobre el macrociclo tetrapirrólico.	36
Esquema N°16. Análisis retrosintético de una porfirina simétrica A_4	37
Esquema N°17. Oxidación de clorina a porfirina.	38
Esquema N°18. Síntesis de TPP utilizando el método de Rothermund.....	38
Esquema N°19. Estructuras resonantes del pirrol según el ataque electrofílico en distintas posiciones.	38
Esquema N°20. Sustitución electrofílica aromática al pirrol.	39
Esquema N°21. Síntesis de octaetilporfirina.	39

Esquema N°22. Síntesis de porfirina TTP.	39
Esquema N°23. Reacción de dos pasos. (A) Condensación de pirrol y aldehído catalizada por ácido que da como producto un tetrafenilporfirinógeno. (B) Oxidación con DDQ a temperatura ambiente para obtener una porfirina como producto final.	41
Esquema N°24. Mecanismo de tetramerización para la obtención del porfirinógeno.	43
Esquema N°25. Síntesis de porfirinas a partir de una mezcla binaria de aldehídos y pirrol.	43
Esquema N°26. Síntesis de porfirinas <i>trans</i> -A ₂ B ₂	44
Esquema N°27. Síntesis de dipirrometanos.	45
Esquema N°28. Síntesis de porfirinas <i>trans</i> -A ₂ B ₂ a partir de dipirrometanos.	45
Esquema N°29. Síntesis de porfirinas ABCD.	46
Esquema N°30. Pasos de síntesis porfirina ABCD.	47
Esquema N°31. Síntesis de porfirina A ₃ B por etapas.	48
Esquema N°32. Síntesis de porfirina A ₃ B a partir de dipirrometanos.	48
Esquema N°33. Formación de tetrapirrol de cadena abierta.	49
Esquema N°34. Mecanismo de obtención de porfirina A ₃ B a partir del intermediario II y aldehído.	50
Esquema N°35. Representación esquemática del mecanismo fotoquímico tipo I (transferencia de electrones y radical hidrógeno) y tipo II (transferencia de energía) de porfirinas.	53
Esquema N°36. Estructura del fullereno C ₆₀	55
Esquema N°37. Estructura anfifílica de fullerenos.	56
Esquema N°38. Síntesis de fullerenos a partir de precursores aromáticos mediante una ciclodehidrogenación catalizada en la superficie de platino. (A) Estructura de la molécula aromática precursora. (B) Molécula adsorbida a temperatura ambiente (300 K) en la superficie del platino. (C) Estructura optimizada del fullereno formado después del proceso de ciclodeshidrogenación a 750 K.	57
Esquema N°39. Vías de síntesis y derivatización del fullereno C ₆₀	58
Esquema N°40. Representación estructural de derivados de fulleropirrolidinas.	58
Esquema N°41. Síntesis de fulleropirrolidina a partir de la cicloadición [3+2] de iluro de azometino.	59

Esquema N°42. Mecanismo de síntesis de la cicloadición 1,3-dipolar para obtener derivados del fullereno C ₆₀ con anillos pirrolidínios.	60
Esquema N°43. Síntesis de distintos derivados de fulleropirrolidinas a partir de la cicloadición [3+2] de iluro de azometino.....	60
Esquema N°44. Estructura de fullerenos C ₆₀ catiónicos con actividad antimicrobiana.	61
Esquema N°45. Representación esquemática de los mecanismos fotoquímicos tipo I (transferencia de carga) y tipo II (transferencia de energía) de fullereno C ₆₀	64
Esquema N°46. Pasos de la PDI para inactivar microorganismos de aguas residuales. (A) Agua con microbios, (B) introducción de la superficie fotoinactivante e irradiación del sistema con luz artificial o natural lo que produce la muerte celular y (C) obtención de agua desinfectada.	70
Esquema N°47. Fotoreactor con circulación de agua para la determinación de la actividad antimicrobiana de membranas con actividad fotodinámica. a) Membrana antibacteriana en estudio; b) camisas con agua de flujo continuo y filtros infrarrojos; c) fuente de irradiación; d) bomba de aire; e) filtro de aire bacteriano; f y g) tres vías para la liberación de presión; h) aireación; j) bomba peristáltica; l) juntas de vidrio para facilitar la limpieza y la esterilización.	71
Esquema N°48. Estructuras químicas de 5,10,15-tris(1-metilpiridinio-4-il)-20-(pentafluorofenil)porfirina (A) y <i>meso</i> -tetrakis(1-metilpiridinio-4-il)porfirina (T ₄ MP _Y P ⁴⁺) (B) empleadas para la desinfección de agua.....	73
Esquema N°49. Estructuras químicas del rosa de bengala (A) y el azul de metileno (B). ..	75
Esquema N°50. Estructura representativa de las películas de celulosa esterificadas con protoporfirina IX (PpIX) (A) y monopiridiltritolilporfirina (C). Película de celulosa plástica con PpIX (B) y con monopiridiltritolilporfirina (D).....	78
Esquema N°51. Representación del sistema empleado para desinfectar agua empleando sílica impregnada con el fotosensibilizador ANT.	79
Esquema N°52. PDI para inactivar microorganismos creciendo en superficies.	80
Esquema N°53. Representación esquemática de la síntesis de: (A) fibras de nylon con pocos sitios de unión (-NH ₂) y (B) la expansión de sitios de unión sobre las fibras de nylon por la adición de un puente poliacrílico que posee un gran número de sitios para unir covalentemente las porfirinas PpIX y ZnPpIX.....	81
Esquema N°54. Diferentes sistemas de irradiación. I) Fotooxidación de DMA, NBT y Trp. II) Inactivación de células de <i>S. aureus</i> en estado planctónico. III) Inactivación de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> en estado planctónico y de biopelículas de <i>S. aureus</i> . A: proyector, B: monocromador, C: celda de cuarzo, D: filtro de agua y E: suspensión de microorganismos, F: policubetas.....	92

Esquema N°55. Síntesis del derivado del fullereno C ₆₀ con un grupo aldehído.....	119
Esquema N°56. Primera metodología de síntesis empleada para obtener la díada TCP-C ₆₀	120
Esquema N°57. Síntesis de la porfirina P1 y P2.	121
Esquema N°58. Estructuras químicas de porfirinas con simetría A ₄ , A ₃ B y A ₂ B ₂	122
Esquema N°59. Síntesis de las díadas TCP-C ₆₀ y TCP-C ₆₀ ⁴⁺	124
Esquema N°60. Estructuras moleculares de TCP, TCP ⁴⁺ , MPC ₆₀ y DAC ₆₀ ⁺	125
Esquema N°61. Reacción de DMA con O ₂ (¹ Δ _g).....	133
Esquema N°62. Formación del DF a partir de la reacción entre ³ FS* y NADH, y entre el O ₂ ⁻ y NBT.	141
Esquema N°63. Reacciones de tipo I y tipo II para Trp.	143
Esquema N°64. Desactivación del O ₂ (¹ Δ _g) y del estado excitado triplete del fotosensibilizador por el caroteno.	145
Esquema N°65. Desactivación del O ₂ (¹ Δ _g) y del estado excitado triplete del fotosensibilizador por el ion azida.....	147
Esquema N°66. Desactivación de los radicales libres R• y HO• por manitol.	149
Esquema N°67. Síntesis del dipirrometano DPM2.	162
Esquema N°68. Síntesis de las porfirinas P3 y P4.	162
Esquema N°69. Síntesis de las díadas TAP-C ₆₀ y TAP-C ₆₀ ⁴⁺	163
Esquema N°70. Estructura química de los fotosensibilizadores TMP-C ₆₀ , TCP-C ₆₀ y TAP-C ₆₀	170
Esquema N°71. Fotografías (A) e imágenes al microscopio (objetivo del microscopio 40x) (B y C) de TCP-C ₆₀ en distintas concentraciones sobre la superficie del ITO.	185
Esquema N°72. (A) Estructura química idealizada del polímero formado por TCP-C ₆₀ . (B) Estructura geométrica optimizada por AM1 para el polímero TCP-C ₆₀	186
Esquema N°73. Película de TCP despegándose de la superficie cuando se sumerge en agua.	187
Esquema N°74. Dibujos representativos de las superficies poliméricas formadas por (A) la díada TCP-C ₆₀ , (B) la bicapa TCP/TCP-C ₆₀ y por (C) TCP/ZnTCP.	189

Esquema N°75. Imagen de la superficie formada por la bicapa TCP/ZnTCP sobre ITO. Microscopía de campo claro (A) y microscopía de fluorescencia (B). 40x microscopio objetivo.....	192
Esquema N°76. Reacción de ABMM con $O_2(^1\Delta_g)$	193
Esquema N°77. Solución con FS, NADH y NBT, antes de irradiar (izquierda) y luego de 60 min de irradiación (derecha).....	195
Esquema N°78. (A) Polímero electroquímico con una gota de 250 μ l de PBS con $\sim 1 \times 10^4$ UFC/ml de <i>S. aureus</i> (B) Sistema de irradiación para inactivar <i>S. aureus</i> sobre la superficie. (C) Imagen al microscopio de colonias de <i>S. aureus</i> en la gota sobre la superficie del polímero TCP-C ₆₀ (objetivo del microscopio 100x).....	200
Esquema N°79. (A) Pequeñas porciones cuadradas de superficie antimicrobiana. (B) Pequeñas superficies poliméricas dentro de la poli cubeta de 96 pocillos con 150 μ l de la suspensión celular de <i>S. aureus</i> en PBS ($\sim 10^4$ UFC/ml).	202
Esquema N°80. Fotografías de las superficies con polímeros electroquímicos de (A) ZnTCP-C ₆₀ , (B) ZnCBZTPA y (C) la bicapa de ZnCBZTPA/CBZTPA, sobre electrodos de ITO.	210
Esquema N°81. Dibujos representativos de las superficies poliméricas formadas por (A) la diáda ZnTCP-C ₆₀ , (B) la bicapa ZnCBZTPA/CBZTPA y por (C) ZnCBZTPA.....	210
Esquema N°82. Soluciones en tolueno de ZnCBZTPA (izquierda) y CBZTPA (derecha).	211
Esquema N°83. Procedimiento para la inactivación fotodinámica de biopelículas de <i>S. aureus</i> creciendo sobre superficies electropolimerizadas.	222
Esquema N°84. Mecanismos de fotosensibilización tipo I y tipo II para diádas porfirina-fullereno C ₆₀	234
Esquema N°85. Diseño de diádas porfirina-fullereno C ₆₀ como fotosensibilizadores para la PDI.	236

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

A

A: absorbancia

ABDA: 9,10-antracenodiilbis(metilen)dimalónico

ABMM: 2,2'-(antraceno-9,10-diil)bis(metilmalonato) de sodio

ACN: acetonitrilo

ADN: ácido desoxirribonucleico

ALA: ácido aminolevulínico

ANT: 2-carboxil-9,10-antraquinona

AOT: 1,4-bis(2-etilhexil)sulfosuccinato de sodio

aPDT: terapia fotodinámica antimicrobiana

ATS: agar tripticasa soya

B

BET: término que proviene del inglés *Back Electron Transfer* y hace referencia al proceso de vuelta de la transferencia de electrones

(BF₃-O(Et)₂): trifluoruro de boro-éter etílico

BHDC: Cloruro de bencil-*n*-hexadecildimetilamonio

BiOH: sustrato de origen biológico

BLEE: β-lactamasas de espectro extendido

BODIPY: nombre asignado a los borodipirrometenos que deriva de su denominación en inglés: *BOron DIPYrrromethenes*

C

Δ: cambio o variación

Car: caroteno

CI: conversión interna

CTS: caldo tripticasa soya

C₆₀: buckminsterfullereno

Cys: cisteína

D

DAC₆₀⁺: *N,N*-dimetil-2-(4-acetamidofenil)fulleropirrolidinio

DBO: demanda biológica de oxígeno

DCM: diclorometano

DCE: 1,2-dicloroetano

DDQ: 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona

DF: diformazán

DMA: 9,10-dimetilantraceno

DMF: *N,N*-dimetilformamida

D₂O: agua deuterada u óxido de deuterio

DODMABr: bromuro de dimetildioctadecilamonio

DPM1: *meso*-(*N*-etil-3-carbazol)dipirrometano

DPM2: *meso*-[4-(3-*N,N*-dimetilamino)propoxil]dipirrometano

DTC₆₀²⁺: *N,N*-dimetil-2-(4-*N,N,N*-trimetilaminofenil)fulleropirrolidinio

E

ε: coeficiente de extinción molar

E_T: energía del estado triplete

F

FS: fotosensibilizador

⁰FS: estado fundamental del fotosensibilizador

¹FS_n^{*}: estado excitado singlete de mayor energía del fotosensibilizador

¹FS^{*}: estado excitado singlete del fotosensibilizador

³FS^{*}: estado excitado triplete del fotosensibilizador

FT-IR: espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

G

GC-MS: cromatógrafo gaseoso acoplado a un detector de masa.

H

Hep-2: línea celular de laringe carcinoma humano

His: histidina

¹HNMR: espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón

HPLC: cromatografía líquida de alta presión

HOMO: orbital molecular de mayor energía ocupado

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

I

I: intensidad de emisión a una cierta λ por parte de una molécula

ISC: entrecruzamiento de sistemas

ITO: óxido de indio dopado con estaño

K

K_{AOT}: constante de distribución en una micela inversa formada por tolueno/AOT/H₂O

k_{obs}: constante de velocidad observada

k_q: constante de *quenching*

L

LED: diodo emisor de luz (*light emitting diode*)

LPS: lipopolisacárido

LUMO: orbital molecular de más baja energía desocupado

M

μ: micromolar

Met: metionina

MPC₆₀: *N*-metil-2-fenilfulleropirrolidina

MS: espectroscopia de masa

MSSA: *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina

MV²⁺: metil viológeno

N

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido

NBT: azul de nitrotetrazolio

η_q: eficiencia en la desactivación del estado excitado singlete de una molécula

O

***o*-DCB:** *orto*-diclorobenceno

•OH: radical hidroxilo

ON: overnight. Cultivo celular con un crecimiento de aproximadamente 12 h

O₂^{•-}: radical anión superóxido

O₂(³Σ_g): oxígeno molecular en estado fundamental

O₂(¹Δ_g): oxígeno molecular singlete

P

P1: 5-(4-(5,5-dimetil-1,3-dioxan-2-il)fenil)-10,15,20-tris[3-(*N*-etilcarbazol)]porfirina

P2: 5-(4-carbonilfenil)-10,15,20-tris[3-(*N*-etilcarbazol)]porfirina

P3: 5-(4-(5,5-dimetil-1,3-dioxan-2-il)fenil)-10,15,20-tris[4-(3-*N,N*-dimetilamino)propoxil]porfirina

P4: 5-(4-carbonilfenil)-10,15,20-tris[4-(3-*N,N*-dimetilamino)propoxil]porfirina

PBS: buffer fosfato salino

PCBZTPA: 5,15-bis[4-(*N,N*-difetilamino)fenil]-10,20-bis[3-(*N*-etilcarbazoil)]porfirina

PDI: inactivación fotodinámica

PDT: terapia fotodinámica

PEG: polietilenglicol

PeT: transferencia de electrones fotoinducida

PMMA: polimetilmetacrilato

PPA904: 3,7-bis(*N,N*-dibutilamino)-fenotiazina-5-io

PpIX: protoporfirina IX

PU: poliuretano

Q

Quencher: molécula que desactiva el estado excitado de otra molécula

Quenching: proceso mediante el cual una molécula desactiva el estado excitado de otra.

R

Φ_F : rendimiento cuántico de fluorescencia

Φ_A : rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete

Φ_T : rendimiento cuántico de producción de triplete

R_r: relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el solvente desde el origen de una placa de TLC

ROS: especies reactivas de oxígeno

rpm: revoluciones por minuto

S

S₀: estado fundamental del fotosensibilizador

S₁: primer estado excitado singlete del fotosensibilizador

S₂: segundo estado excitado singlete del fotosensibilizador

SEM: microscopia electrónica de barrido

S_EAr: sustitución electrofílica aromática

T

τ : tiempo de vida del estado excitado de una molécula

τ^3 : tiempo de vida del estado excitado triplete de una molécula

TAP-C₆₀: *N*-metil-2'-[5-(4-(*N*-metilfulleropirrolidin-2-il)fenil)-10,15,20-tris[4-(3-*N,N*-dimetilamino)propoxil]]

TBAP: perclorato de tetra-*N*-butilamonio

TBO: azul de toluidina O

TCP: 5,10,15,20-tetrakis[3-(*N*-etilcarbazoil)]porfirina

TCP⁴⁺: 5,10,15,20-tetrakis[3-(*N*-etil-*N*-metilcarbazoil)]porfirina

TCP-C₆₀: *N*-metil-2'-[5-(4-(*N*-metilfulleropirrolidin-2-il)fenil)-10,15,20-tris(3-(*N*-etilcarbazoil))]porfirina]

TEA: trietilamina

TEOA: trietanolamina

TFA: ácido trifluoracético

THF: tetrahidrofurano

TLC: cromatografía de capa fina. Sus siglas provienen de su denominación en inglés *Thin Layer Chromatography*

TMAP⁴⁺: 5,10,15,20-tetrakis(4-*N,N,N*-trimetilamoniofenil)porfirina

TMN: *N,N,N',N'*-tetrametil-1,1'-naftidina

TMP: 5,10,15,20-tetrakis(4-metoxifenil)porfirina

T₄MP_yP⁴⁺: *meso*-tetrakis(1-metilpiridinio-4-il)porfirina

TPP: 5,10,15,20- tetrakis(fenil)porfirina

TPPS⁴⁻: 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenil)porfirina

Tri-Py⁺-Me-PF: 10,15-tris(1-metilpiridinio-4-il)-20-(pentafluorofenil)-porfirina

TRIP[4]: 5-fenil-10,15,20-tris(*N*-metil-4-piridil)porfirina

Trp: L-triptófano

Tyr: tirosina

U

UFC: unidades formadoras de colonias

UV: ultravioleta

V

VC: voltametría cíclica

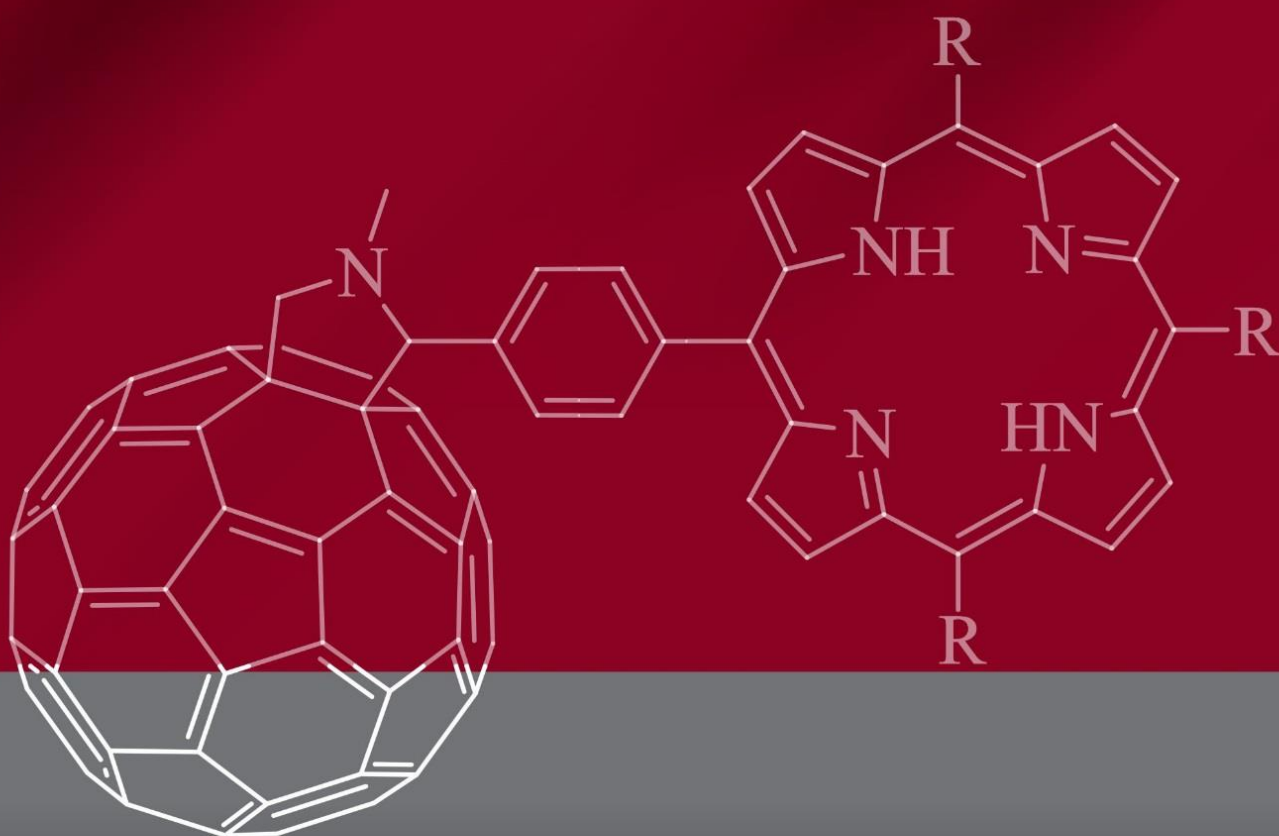
W

W₀: relación molar [agua]/[surfactante]

Z

ZnPCBZTPA: Zn(II) 5,15-bis[4-(*N,N*-difenilamino)fenil]-10,20-bis[3-(*N*-etilcarbazoil)]porfirina

ZnTCP: Zn(II) 5,10,15,20-tetrakis[3-(*N*-etilcarbazoil)]porfirina



CAPÍTULO I

Introducción

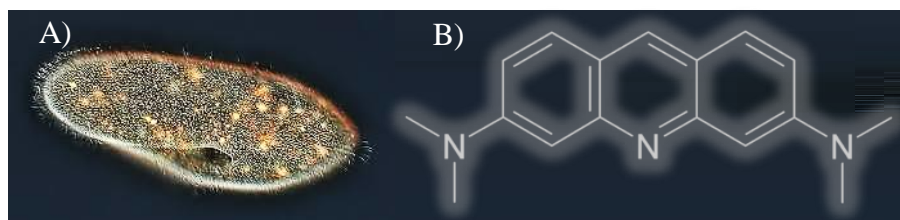
CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Inactivación fotodinámica

1.1.1. Origen de la inactivación fotodinámica

La terapia fotodinámica, también conocida como PDT por su denominación en inglés *photodynamic therapy*, representa una modalidad bien establecida para el tratamiento de tumores malignos.¹⁻² En la actualidad, esta técnica se aplica en el área clínica.³⁻⁴ Sin embargo, continúan las investigaciones *in vivo* para que en un futuro se pueda emplear en la terapia de cánceres difíciles de tratar como por ejemplo la leucemia.⁵⁻⁶ Por otro lado, en las últimas décadas, la investigación y el desarrollo en este campo ha permitido el uso de fotosensibilizadores en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Esta metodología se ha denominado inactivación fotodinámica o PDI por las siglas del inglés *photodynamic inactivation*. También se conoce como terapia fotodinámica antimicrobiana (aPDT), nombre que deja entrever los orígenes de este tratamiento alternativo para la erradicación de microbios.⁷ La posibilidad de matar microorganismos a través de la acción combinada de la luz visible y de un fotosensibilizador se descubrió a comienzos del siglo XX, cuando Oscar Raab, un estudiante de medicina de la universidad de Ludwig-Maximilian (Munich, Alemania), observó que al incubar paramecios (organismos unicelulares de la clase Protista, Esquema N°1A) con pequeñas concentraciones de naranja de acridina (Esquema N°1B) morían al ser expuestos a la luz del día pero sobrevivían en la oscuridad. Este descubrimiento fue accidental, es lo que hoy la ciencia llama una serendipia.⁷ Estos resultados se publicaron hacia 1900 y el profesor Hermann von Tappeiner junto a Albert Jesionek, propusieron varias aplicaciones dermatológicas para estas sustancias que actuaban como fotosensibilizadores.⁸



Esquema N°1. (A) Fotografía de *Paramecium caudatum*. (B) Estructura de la molécula naranja de acridina.

Las observaciones de Raab se repitieron con una gran variedad de organismos unicelulares y pluricelulares, hasta que en 1904 Jodlbauer y von Tappainer demostraron que la presencia del oxígeno era un requisito fundamental para que la fotosensibilización

ocurriese. Ellos utilizan por primera vez el término “*photodynamische wirkung*”, haciendo énfasis en el requerimiento de oxígeno en el proceso. El término alemán se tradujo al inglés como “*photodynamic action*” y actualmente se hace referencia al mismo como efecto o actividad fotodinámica.⁸

El potencial uso de la PDT en contra de enfermedades de origen microbiano, no se explotó hasta finales del siglo XX. Esto se debe, a que ciertos agentes fotosensibilizadores utilizados para el tratamiento de tumores (derivados del xanteno, de la acridina y porfirinas cargadas negativamente) no resultaban efectivos para combatir algunos de los patógenos más conocidos en su momento (bacterias Gram negativas y protozoos en etapa quística).⁹⁻¹⁰

Un paso importante en el escenario global de los antimicrobianos empleando la PDI, se produjo durante la década de 1990. En esta época, los descubrimientos realizados de forma independiente por tres grupos de investigación, mostraron que la luz visible activaba fotosensibilizadores catiónicos que pertenecen a la familia de las fenotiazinas,¹¹ porfirinas¹² y ftalocianinas.¹³ Además, estos fotosensibilizadores inducían una muerte rápida y eficiente de bacterias Gram negativas, tales como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* además de producir la inactivación de hongos y bacterias Gram positivas.

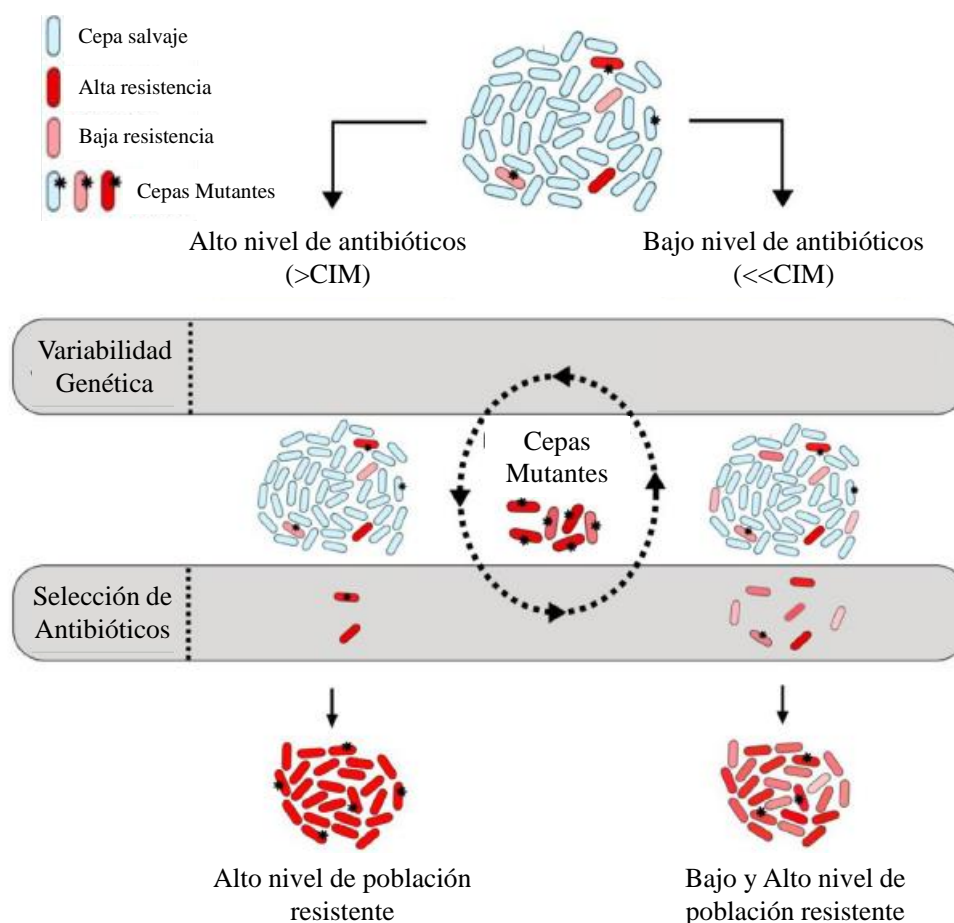
1.1.2. Resistencia microbiana

El descubrimiento de los antibióticos planteó la creencia de que las enfermedades microbiológicas se reducirían gradualmente hasta un nivel en el que ya no tendrían un grave impacto en la salud humana. Sin embargo, en la actualidad el tratamiento de enfermedades infecciosas está siendo cada vez más cuestionado por los rápidos cambios evolutivos de los microorganismos, el gran número de patógenos encontrados y por la aparición continua de cepas resistentes a múltiples fármacos.¹⁴ Como consecuencia, ciertas infecciones que en el pasado podían ser tratadas fácilmente, hoy conducen a una mayor morbilidad y pueden poner en riesgo la vida de un paciente incluso en un ambiente hospitalario.¹⁵ Este problema se agrava aún más por la gran variedad de mecanismos adoptados por las células microbianas para aumentar su resistencia a las agresiones externas. Estos incluyen un engrosamiento de su pared exterior, la codificación de nuevas proteínas que impiden la penetración de los fármacos, la aparición de mutantes deficientes en los canales porina que permiten la afluencia de productos químicos añadidos externamente, entre otros.¹⁶ Por lo mencionado anteriormente, hasta el momento no se ha identificado una estrategia integral para el tratamiento de enfermedades infecciosas. En este sentido, la PDI podría convertirse en una herramienta que permita encontrar una solución al problema planteado.

Algunas de las causas de la emergencia de resistencia a antibióticos de uso corriente son: el abuso de antibióticos en los hospitales como medida de profilaxis en las operaciones quirúrgicas, la tendencia a utilizar antibióticos de amplio espectro, la prescripción inadecuada, la automedicación, el incumplimiento de los tratamientos por parte de los pacientes y su utilización extendida en el alimento del ganado (Esquema N°2).¹⁷⁻²⁰ También se puede mencionar la hospitalización prolongada, las enfermedades crónicas, las intervenciones quirúrgicas, la internación en terapia intensiva, la inserción de dispositivos invasivos y el incumplimiento de las normas de aislamiento y de las medidas de bioseguridad.²¹ Para citar un ejemplo, en la Ciudad de La Plata (Argentina), con el fin de estudiar las conductas de consumo y de auto-medicación con antibióticos, se llevó a cabo una encuesta a 482 habitantes de dicho lugar. Los resultados indican que aunque la automedicación es percibida como una conducta riesgosa por la población encuestada, el 53 % de la misma consume, al menos ocasionalmente remedios sin prescripción médica, debido principalmente a falta de tiempo y a la percepción de que no siempre es necesaria una consulta al médico para diagnosticar la enfermedad y elegir el tratamiento adecuado.²²

El descubrimiento de la penicilina en 1928 por el Dr. Alexander Fleming y el posterior desarrollo de los antibióticos fueron los más significativos avances que revolucionaron la práctica de la medicina.²³ Las penicilinas son antibióticos del grupo de los β -lactámicos empleados en el tratamiento de infecciones provocadas por bacterias sensibles.²⁴ Sin embargo, cuando el Dr. Fleming recibe el premio nobel en 1945, ya en su discurso advierte de la existencia de cepas microbianas resistentes a fármacos de la siguiente manera: “Pero me gustaría hacer sonar una nota de advertencia. La penicilina es a todos los efectos, no venenosa así que no hay necesidad de preocuparse por dar una sobredosis y la intoxicación del paciente. Sin embargo, puede haber peligro a bajas dosis del fármaco. No es difícil hacer en el laboratorio que los microbios adquieran resistencia a la penicilina mediante la exposición a concentraciones suficientes para no matarlos, y lo mismo ha ocurrido en ocasiones en el cuerpo. Puede llegar el momento en el que la penicilina pueda ser comprada por cualquier persona en las tiendas. Luego, existe el peligro de que el hombre ignorante, pueda administrarse a sí mismo fácilmente una dosis demasiado baja y mediante la exposición de sus microbios a cantidades no letales de la droga generar organismos resistentes. Aquí es un ejemplo hipotético: el Sr. X. tiene un dolor de garganta. Él compra un poco de penicilina y se la administra a sí mismo, no es suficiente para matar a los estreptococos, pero suficiente para que los microorganismos adquieran resistencia a la penicilina. A continuación, infecta a su esposa. A la señora X le da pulmonía y se trata con

penicilina. Como los estreptococos son ahora resistentes a la penicilina, el tratamiento falla. La señora X muere ¿Quién es el principal responsable de la muerte de la señora X? El Sr. X, porque el uso negligente de la penicilina ha cambiado la naturaleza de los microbios. Moraleja: si utiliza la penicilina, use suficiente.”²⁵



Esquema N°2. Resistencia de las bacterias a los antibióticos. Adaptado de referencia 19.

1.1.3. Infecciones intrahospitalarias

Las infecciones que se adquieren tanto en hospitales como en salas ambulatorias, representan más del 90% de las infecciones totales y son el evento adverso más frecuente. Además, representan altos costos para las entidades de la salud e impactan en las condiciones de vida individual y familiar. En el mundo, el 60% de la mortalidad se debe a neumonías e infecciones del torrente sanguíneo asociadas a catéteres. Solamente en los Estados Unidos representan la octava causa de muerte.²⁶ La Organización Mundial de la Salud, en su informe sobre enfermedades por infecciones asociadas a la atención de la salud, reporta una prevalencia de entre 5,7-19,1% en los hospitales de mediana y alta complejidad.²⁶ En Latinoamérica, las infecciones por bacterias resistentes son generalizadas y es una limitación

para el tratamiento adecuado de pacientes infectados tanto en un área hospitalaria como en la comunidad. Las altas tasas de resistencia a los antibióticos reportadas en hospitales son una creciente amenaza, incluyendo *Staphylococcus aureus* meticilina resistente, *Enterobacteriaceae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenemas. Según el estudio realizado por SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*), América Latina presentó niveles de resistencia microbiana más altos que otras regiones evaluadas como Estados Unidos de América y Europa.²⁷⁻²⁸ En Suramérica se reporta una mayor prevalencia de los microorganismos *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*.²⁹ La mortalidad por *S. aureus* resistente es 2,5 veces mayor que por *S. aureus* sensible.³⁰

S. aureus resistente a la meticilina (MRSA) es el principal microorganismo que causa infecciones en los hospitales dado que se transmite de un paciente a otro a través de las manos del trabajador durante la atención médica, por ambientes contaminados o directamente, de un paciente a otro.³¹ Además, las personas hospitalizadas son vulnerables a las infecciones por este microbio, ya que suelen tener dispositivos permanentes, están inmunodeprimidos o han tenido procedimientos quirúrgicos. Las opciones de tratamiento son limitadas para los pacientes con infecciones por MRSA. Además, los costos para su tratamiento son superiores a los requeridos contra *S. aureus* sensible a la meticilina (MSSA).³² Varias organizaciones han desarrollado guías basadas en la evidencia para ayudar a los hospitales a reducir este problema.³³⁻³⁴ Sin embargo, los hospitales rurales no tienen el apoyo y los fondos para la prevención y supervisión de MRSA, siendo que este microbio resistente es endémico en algunas de estas zonas.³⁵

Países de todo el mundo están sufriendo las consecuencias de las infecciones producidas por microorganismos resistentes. En Italia, en el año 2012 llevan a cabo la primera encuesta de epidemiología de *S. aureus* en 52 centros de atención de la salud y, de un total de 21.873 agentes patógenos analizados, la prevalencia de MRSA fue del 35,8%.³⁶ Este microbio no pudo ser erradicado con tetraciclina, rifampicina, clindamicina y gentamicina. Por lo tanto, en Italia las infecciones producidas por este microbio representan el 11,6% del total siendo un tercio de este porcentaje MRSA.³⁶ En Brasil, se ha desarrollado un programa de vigilancia de las bacterias resistentes a múltiples fármacos en los hospitales y se encontraron cepas resistentes de *Acinetobacter baumannii* y *Klebsiella pneumoniae* principalmente, microorganismos que se encuentran en la sangre y en las vías urinarias y que son capaces de producir neumonía en sitios con intervenciones quirúrgicas.³⁷ En África, un grupo de investigadores de Ghana estudió la diversidad genética de *S. aureus* con

muestras nasales tomadas del personal y de los pacientes hospitalizados.³⁸ El 13,9% de los pacientes y el 23,3% de los trabajadores son portadores de *S. aureus* lo que aumenta la probabilidad de que este microbio sea contagiado entre pacientes del hospital.³⁸ En Irlanda, un grupo de investigadores estudió la presencia de este microbio en el ambiente, en las superficies y en pacientes hospitalarios.³⁹ Los investigadores hallaron MRSA en 30 de los 706 pacientes, un 14,4% de este microorganismo resistente en el aire y un 3,3% en la superficie del medio ambiente.³⁹ En este mismo país, se estudió la contaminación ambiental por MRSA en una sala de radiología, encontrándose en la superficie del equipo de resonancia magnética, una muestra positiva de MRSA.⁴⁰ En Escocia, un grupo de investigadores estudió el efecto de administrar en exceso antibióticos a pacientes hospitalizados y de la comunidad.⁴¹ Este análisis se llevó a cabo con 1.289.929 hospitalizaciones y 455.508 adultos registrados en la atención primaria. Se encontró que al reemplazar los llamados 4C (cefalosporinas, amoxicilina-ácido clavulánico, clindamicina y fluoroquinolonas) por otros antibióticos y al medicarlos por encima del umbral en casos que así lo requerían, la prevalencia de MRSA disminuyó en un 54% en el hospital y en un 37% en la comunidad.⁴¹ En Omán, se tomaron muestras nasales y de las fundas de los teléfonos celulares de estudiantes de medicina y de profesionales de la salud del hospital.⁴² La colonización nasal por MRSA se encontró en 47 individuos y en 28 fundas de celulares. Además, los microbios resultaron resistentes a la eritromicina (48%), a la clindamicina (29%) y a la vancomicina (9,3%).⁴² En Japón, se estudiaron las infecciones en el torrente sanguíneo de distintos pacientes y lo que los autores encontraron es que la susceptibilidad de estos microorganismos a la penicilina, clindamicina y eritromicina fue del 100%, 95% y 85%, respectivamente.⁴³ Esta baja susceptibilidad a la eritromicina se explica en parte por la sobre prescripción de antibióticos en pacientes ambulatorios de Japón lo que trae como consecuencia una resistencia por parte de los microbios. En Colombia, se encontró que las infecciones *post* operatorias y urinarias son las más frecuentes y producidas por microorganismos con alta resistencias como *Pseudomonas aeruginosa*, seguida por *S. aureus* y enterobacterias (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*).⁴⁴ Los factores de riesgo asociados a la infección producida por estos microbios son: una estancia hospitalaria durante seis días o más, empleo previo de β -lactámicos y uso de ventilador mecánico durante un tiempo mayor a 5 días.⁴⁴ En New York se mostró que las infecciones producidas por MSSA se desarrollan por la colocación de catéteres venosos centrales y por enfermedades renales crónicas⁴⁵.

En Argentina también se han reportado artículos académicos sobre infecciones causadas por microorganismos resistentes aunque el número es acotado. Entre los años 2000-

2004, en dos hospitales de máxima complejidad en Buenos Aires, se aislaron muestras clínicas (hemocultivo, urocultivo, punta de catéter y absceso) pertenecientes a pacientes de ambos sexos, internados y ambulatorios. Se encontró en dichas muestras diferentes estafilococos hospitalarios sensibles y resistentes a la meticilina. Los autores evaluaron la acción de siete biocidas contra dichos microbios encontrando que el digluconato de clorhexidina, la yodopovidona, la tintura de yodo débil y el glutaraldehído alcalino son eficaces contra la mayoría de las cepas.⁴⁶ Entre los años 2004-2005, se diagnosticaron 200 infecciones producidas por *S. aureus* en niños de entre 4-6 años siendo 32 de dichas infecciones causadas por MRSA. Solamente 5 niños recibieron tratamiento antibiótico juzgado como concordante al ingreso, en el resto de los pacientes el tratamiento se adecuó posteriormente a la obtención del cultivo y el antibiograma. En 24 niños fue necesario una intervención quirúrgica terapéutica, en 12 el tratamiento indicado fue vancomicina y al resto se les administró clindamicina como tratamiento.⁴⁷ Por otro lado, entre los años 1996 y 2010 se estudiaron 1873 aislamientos de *Enterococcus* spp. pertenecientes a pacientes internados en un hospital universitario de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires con infección intrahospitalaria. El 64,2% y el 30,4% de los aislamientos correspondieron a *E. faecalis* y *E. faecium*, respectivamente. El primer aislamiento de enterococo resistente a vancomicina se detectó en el año 1998 y correspondió a un *E. faecium* y en el año 2004 se halló en *E. faecalis*. En el año 2010 más del 70% de los aislamientos de *E. faecium* eran resistentes a vancomicina.⁴⁸ Durante el año 2009, se estudió la flora microbiana oral de niños entre 4-8 años que recibieron atención odontológica en la clínica de Odontopediatría de la Facultad de Odontología UDELAR. Los autores de esta investigación encontraron que 12 niños tenían cepas de *Streptococcus mitis* resistentes a Amoxicilina y que los mismos habían consumido Amoxicilina como último antibiótico.⁴⁹ Por otro lado, este mismo año se llevaron a cabo estudios de portación nasal de *S. aureus* en pacientes ambulatorios que concurrieron al Centro de Atención Primaria de la Salud en la provincia de Santa Fe por razones de enfermedad, controles y vacunación. Los investigadores encontraron que tanto hombres como mujeres portaban este microorganismo y que el 21% correspondía a MRSA.⁵⁰

Cabe destacar, que distintas entidades Argentinas y Latinoamericanas tales como el Ministerio de Salud y Agroindustria, la Sociedad Argentina de Infectología, la red de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos WHONET-Argentina, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos, entre otros, trabajan para controlar la resistencia microbiana en nuestro país a través de la creación de programas de vigilancia del uso de

antimicrobianos y a través de la concientización de la población haciendo uso de los distintos medios de comunicación.

En esta sección se han presentado algunos de los casos más actuales publicados con respecto a infecciones hospitalarias producidas principalmente por *S. aureus*. Es posible observar que este microorganismo está afectando la salud de la población mundial por lo que es imperativa la búsqueda de una nueva terapia para hacerle frente a esta situación. Una alternativa es la inactivación fotodinámica.⁵¹ Es así, que en esta tesis doctoral se ha estudiado dicha terapia buscando, por un lado nuevos agentes fotosensibilizadores para erradicar microorganismos que producen infecciones en pacientes hospitalizados, y por otro lado, la creación de superficies estériles con el objetivo de prevenir o evitar el crecimiento excesivo de *S. aureus* en distintas superficies hospitalarias. Cabe destacar, que los ensayos se desarrollaron con *S. aureus* sensible a la meticilina porque el laboratorio de estudio de la Universidad Nacional de Río Cuarto, no cuenta con la bioseguridad necesaria para trabajar con MRSA.

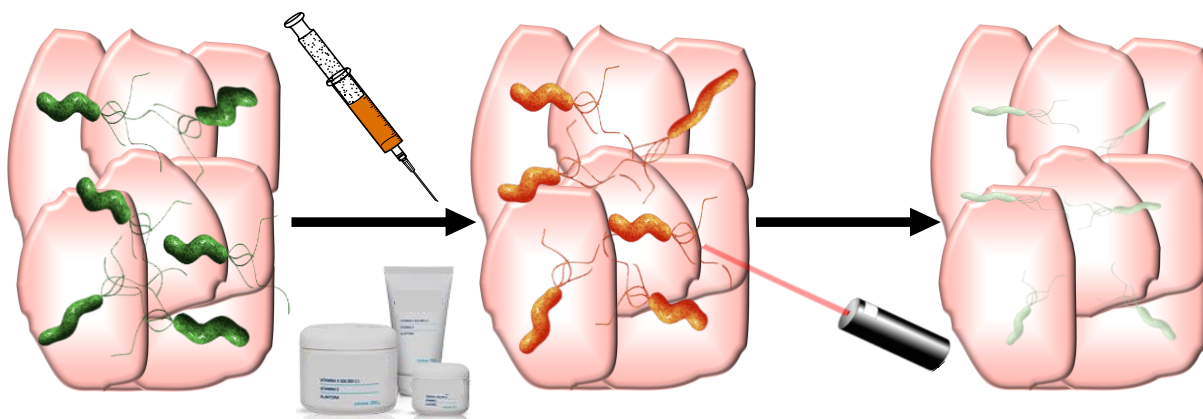
1.1.4. Fundamentos y condiciones óptimas para la PDI

En busca de una solución a la falta de antibióticos eficaces para erradicar bacterias resistentes a fármacos, es que se están desarrollando nuevas drogas y metodologías.⁵¹

Como modalidades antimicrobianas se han reportado las siguientes propuestas:⁵²⁻⁵³

- ✓ La modificación del fenotipo bacteriano, que consiste en cambiar las características morfológicas y de desarrollo además de las propiedades bioquímicas, la conversión fenotípica a la resistencia a los antibióticos y el fenotipo menos virulento.⁵⁴
- ✓ La terapia con bacteriófagos, basada en el uso de fagos que son virus que invaden a las células bacterianas y, en el caso de fagos líticos, alteran el metabolismo bacteriano causando lisis.⁵⁵
- ✓ Uso de bacteriocinas, péptidos secretados por una amplia variedad de bacterias con el propósito de eliminar la competencia del medio.^{52, 56}
- ✓ Empleo de los llamados no-antibióticos. En farmacología las drogas se clasifican en agentes antimicrobianos y drogas para el tratamiento de enfermedades no infecciosas.⁵⁷ Los compuestos desarrollados para tratar dolencias no infecciosas, pero con actividad antimicrobiana, son conocidos como los no-antibióticos.⁵⁸⁻⁶⁰
- ✓ La fotosensibilización, metodología en la que se basa esta tesis, la cual consiste fundamentalmente en tres etapas que se resumen en el Esquema N°3:

- 1) la acumulación preferencial del fotosensibilizador en las células microbianas luego de ser administrado por vía intravenosa o de manera tópica,
- 2) la iluminación del área afectada con luz de longitud de onda apropiada en presencia de oxígeno, que induce la actividad fotodinámica a través de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS por su denominación en inglés *Reactive Oxygen Species*),
- 3) la reacción de tales especies con ciertas macromoléculas de la célula bacteriana, lo que conduce a un daño letal en los microorganismos.⁶¹⁻⁶²



Esquema N°3. Etapas de la inactivación fotodinámica para el tratamiento de tejidos infectados.

La primera etapa de la inactivación fotodinámica, depende del tiempo de incubación de las células patógenas con el fotosensibilizador. En el caso de las bacterias, la unión debe ser de unos pocos minutos, independientemente del tipo de molécula que se emplee. Este paso es de suma importancia debido a que la dosis de fotosensibilizador es del orden micromolar. Así, a esta concentración no hay acumulación significativa de estas moléculas en las células mamíferas del huésped.⁶³ La segunda etapa de la PDI, que consiste en la irradiación de una lesión infectada, se lleva a cabo minutos después de la deposición tópica del fotosensibilizador. Posteriormente, se producen ROS que dan lugar a una disminución de la flora microbiana sin producir un daño apreciable en el tejido del huésped, lo que consiste en la tercera etapa de la PDI.⁶⁴⁻⁶⁵

La selectividad del fotosensibilizador por las células microbianas, se demostró experimentalmente por investigaciones *in vitro* que ponen de manifiesto que los fibroblastos y queratinocitos, algunos de los componentes más frecuentes de tejidos humanos, no muestran ningún daño en condiciones de irradiación que provocan una disminución de 5 log en la supervivencia de los agentes infecciosos bacterianos típicos, tales como *E. coli* y *S. aureus* resistente a la meticilina.⁶⁶ Por otra parte, tejidos blandos de ratones infectados con *S. aureus*, se trataron con PDI causando una disminución de 3 log en la población bacteriana

y ocasionando un daño mínimo en el tejido del huésped después del tratamiento.⁶⁷ En un trabajo reciente, se sintetizaron 13 porfirinas con tres aminoácidos diferentes unidos en posiciones *meso*: L-lisina, L-histidina y L-arginina. La molécula con cuatro grupos L-lisina en concentración de 4 μM , resultó ser la más efectiva para la PDI de *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA), *E. coli* y *P. aeruginosa*.⁶⁸ En estas condiciones, con una dosis de luz de 6 J cm^{-2} , el nuevo compuesto presentó una baja toxicidad en células eucariotas de ratón.⁶⁸ Por lo tanto, la PDI posee selectividad dual, primero debido a que el fotosensibilizador se acumula preferencialmente en las células de los microorganismos, y en segundo lugar, debido a que se irradia sólo la zona afectada.⁶⁹ Las condiciones óptimas de la PDI para producir una disminución drástica en el número de agentes patógenos y ocasionar un daño mínimo en los tejidos del huésped, se resumen en la (Tabla N°1).⁷⁰

Tabla N°1. Condiciones óptimas para producir inactivación fotodinámica ocasionando un daño mínimo en las células huésped.⁷⁰

<i>Parámetro</i>	<i>Condiciones óptimas</i>
<i>Estructura química del fotosensibilizador</i>	Fenotiazinas, ftalocianinas, derivados de fullerenos C_{60} , clorinas, bacterioclorinas, porfirinas catiónicas, entre otros
<i>Factores estructurales que mejoran la actividad antimicrobiana</i>	Cadenas hidrocarbonadas, polipéptidos catiónicos, factores específicos (anticuerpos)
<i>Tiempo de incubación previa a la irradiación</i>	5 – 10 min (bacterias Gram positivas). Hasta 30 min (bacterias Gram negativas y hongos)
<i>Concentración del fotosensibilizador</i>	0,1 – 5 μM
<i>Fuerza Iónica</i>	La eficiencia es independiente de la concentración de sales
<i>Fluencia</i>	Menor a 50 mW cm^{-2}
<i>Tiempo de irradiación</i>	Menor a 30 min (10 J cm^{-2})

1.1.5. Ventajas de la PDI

Diversos estudios indican que la PDI es particularmente adecuada para el tratamiento de infecciones microbianas localizadas, incluyendo aquellas que se han vuelto crónicas después de tratamientos prolongados.⁷⁰⁻⁷² Se pueden mencionar un gran número de características favorables:

a) La posibilidad de desarrollar regímenes de tratamiento que actúan de manera eficiente contra la mayoría de los patógenos microbianos, incluyendo bacterias, levaduras, hongos, protozoos y parásitos.^{62, 73-74}

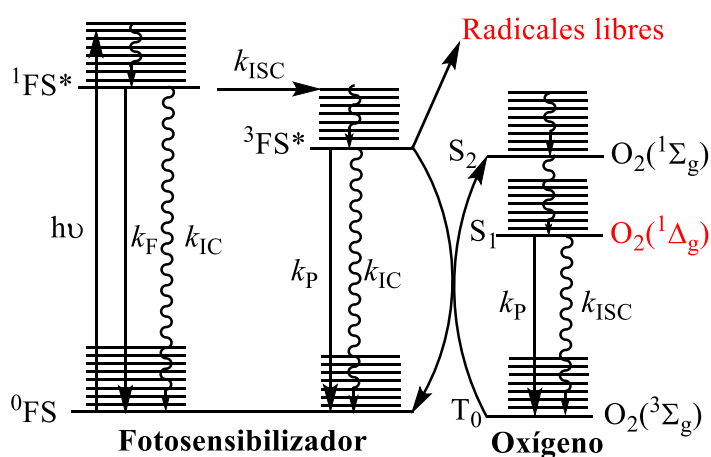
- b) La alta susceptibilidad exhibida por un gran número de cepas microbianas sin aparición de especies resistentes, incluso después de múltiples tratamientos.⁷⁵⁻⁷⁶ Esto se debe a que el daño producido en las células por las ROS ocurre a través de un mecanismo de muerte inespecífica en comparación con los antibióticos que generalmente inhiben una enzima en particular.⁷⁷⁻⁷⁹
- c) El bajo riesgo de inducir efectos genotóxicos y mutagénicos tanto en las células del huésped como en las microbianas.^{61, 80}
- d) La posibilidad de ser aplicada sola o combinada con otros antibióticos.⁸¹⁻⁸³
- e) La selectividad del agente por el microorganismo. El patógeno es inactivado con una concentración de fotosensibilizador y con una dosis de luz, mucho más bajas que las necesarias para un efecto similar en células eucariotas (sección 1.1.4.).⁸⁴
- f) La rápida velocidad de acción de la PDI en comparación con los antibióticos que normalmente requieren muchos días o semanas para ser eficaces, haciendo que los microorganismos mueran y se vuelvan resistentes a los fármacos.⁸⁵
- g) La irradiación puntual sobre el área afectada lo que permite localizar el tratamiento. Incluso, infecciones profundas pueden ser asistidas con esta terapia, gracias a los avances continuos en la tecnología de fibra óptica.⁸⁶⁻⁸⁹
- h) La capacidad de inactivar especies resistentes a múltiples fármacos incluso de una manera más eficaz que a las sepsas nativas.⁸⁵

Por todas las ventajas que posee la PDI, es probable que en un futuro se convierta en una opción terapéutica convencional. Sin embargo, este tipo de tratamiento está en pleno desarrollo y es necesario continuar con las investigaciones para encontrar fotosensibilizadores eficientes.

1.1.6. Mecanismos de fotosensibilización

Los procesos por los cuales la combinación de un fotosensibilizador (FS), luz y oxígeno dan lugar a la muerte de los microorganismos, se ilustran en los Esquema N°4 y Esquema N°5. Inicialmente, el estado fundamental del FS es un estado singlete, es decir, tiene un par de electrones apareados con espines opuestos en un orbital molecular.⁷² Cuando es excitado con luz de longitud de onda apropiada, uno de sus electrones es promovido desde el orbital molecular más alto ocupado (conocido como HOMO por sus siglas en inglés *Highest Occupied Molecular Orbital*) hacia el orbital molecular de menor energía desocupado (llamado LUMO por su denominación en inglés *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*). Durante este proceso el electrón conserva su espín. Este estado de excitación, es

conocido como estado excitado singlete ($^1\text{FS}^*$) y es de corta vida, generalmente del orden de unos nanosegundos.⁷² El $^1\text{FS}^*$ puede perder su energía de excitación por la emisión de un fotón (proceso conocido como fluorescencia) o por una relajación vibracional no radiativa que convierte la energía interna en calor (conocido como conversión interna o CI). Además, desde tal estado puede ocurrir un entrecruzamiento de sistemas (ISC por sus siglas en inglés *InterSystem Crossing*) al estado excitado triplete ($^3\text{FS}^*$) debido a un acoplamiento espín-órbita.⁷² En este estado, la energía del fotosensibilizador puede disiparse por un proceso radiativo denominado fosforescencia o por un decaimiento térmico no radiativo. El estado triplete excitado tiene un tiempo de vida más largo que el singlete (del orden de micro y milisegundos) debido a que el electrón en el LUMO posee un espín paralelo al del HOMO en un orbital molecular. Por lo tanto, el electrón en el estado excitado no puede volver tan fácilmente a su estado fundamental, ya que es un proceso prohibido por espín y violaría el principio de exclusión de Pauli.⁷² Todo lo antes explicado se muestran en el Esquema N°4.



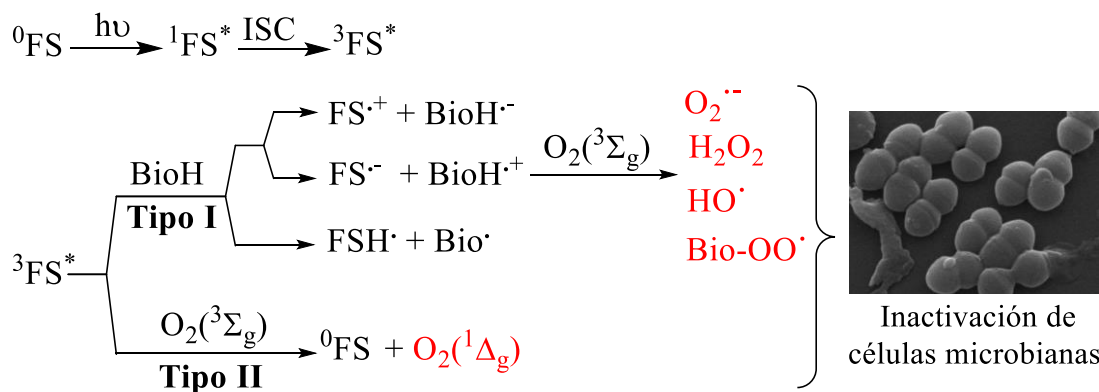
Esquema N°4. Diagrama de Jablonski modificado para un fotosensibilizador.

La fotoactivación del fotosensibilizador puede conducir a dos tipos de procesos fotoquímicos, uno de los cuales involucra la generación de radicales libres con la posterior formación de ROS (reacción fotoquímica tipo I, Esquema N°5) y el otro la formación de oxígeno molecular singlete, $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (reacción fotoquímica tipo II, Esquema N°5).^{8, 90}

En ambos mecanismos fotoquímicos, el fotosensibilizador en el estado fundamental (^0FS) es excitado por la luz a un estado $^1\text{FS}^*$ seguido por un ISC a un estado $^3\text{FS}^*$. En el proceso tipo I, el $^3\text{FS}^*$ reacciona con un sustrato de origen biológico, BioH, para producir iones radicales o radicales libres a través de reacciones de transferencia de electrones o de protones. La transferencia de electrones entre el fotosensibilizador y el sustrato, está

controlada por los potenciales de oxidación y de reducción relativos de las dos especies.⁷⁰ La mayoría de estos radicales reaccionan instantáneamente con oxígeno molecular en su estado fundamental generando radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\bullet OH$).⁷³ Estos intermediarios son capaces de oxidar a una gran variedad de biomoléculas y por lo tanto, ocasionar la muerte de los microorganismos. Aunque el H_2O_2 y $O_2^{\bullet-}$ son especies tóxicas, se presume que el proceso oxidativo del mecanismo tipo I se debe principalmente al $\bullet OH$. Al igual que el H_2O_2 el $\bullet OH$, puede atravesar fácilmente las membranas biológicas produciendo daños en las células microbianas.⁹¹

Por otro lado, en la reacción fotoquímica tipo II, el $^3\text{FS}^*$ transfiere su energía al oxígeno en estado fundamental triplete ($\text{O}_2(^3\Sigma_g)$) formando $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (Esquema N°5). Para que este proceso ocurra, es necesario que exista un acoplamiento espín-espín así se produce un cambio de multiplicidad simultáneo entre el fotosensibilizador y el $\text{O}_2(^3\Sigma_g)$.⁹² En el proceso de transferencia de energía, una única molécula de FS puede participar en varios ciclos generando catalíticamente $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. La larga vida del estado triplete del FS le permite reaccionar con el oxígeno en su estado fundamental y ocasionar un daño oxidativo en las envolturas celulares de los microorganismos.⁹³ El rendimiento cuántico de producción de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (Φ_Δ) por parte del FS es un parámetro importante para evaluar su potencial aplicación en PDI. En principio, $^1\text{FS}^*$ y $^3\text{FS}^*$ podrían generar $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, sin embargo debido a que el tiempo de vida de $^1\text{FS}^*$ es relativamente corto, es que $^3\text{FS}^*$ es la especie responsable de la producción del $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. El valor de Φ_Δ depende de las condiciones experimentales utilizadas para su determinación, como lo son el tipo de solvente y las características del fotosensibilizador.⁸



Esquema N°5. Mecanismos de acción fotodinámica tipo I y tipo II.

Los dos mecanismos de fotosensibilización pueden ocurrir simultáneamente y la relación entre ambos depende del fotosensibilizador, el sustrato y la naturaleza del medio.⁹⁴⁻⁹⁶ En aquellos sistemas en los cuales la concentración de oxígeno molecular es baja, el mecanismo de fotorreacción es principalmente el tipo I, mientras que cuando el medio es oxigenado adquiere importancia la formación de $O_2(^1\Delta_g)$.⁹⁷ Cuando el fotosensibilizador utilizado posee características hidrofóbicas, se ubica principalmente en la membrana celular en donde la concentración de oxígeno es relativamente alta. En este caso, el mecanismo tipo II es el principal responsable de la acción fotodinámica. Así mismo, la transferencia de electrones entre el $^3FS^*$ y un sustrato de origen biológico capaz de oxidarse o reducirse (BioH), es favorecida en solventes polares. Por lo contrario, los solventes poco polares benefician las fotorreacciones del tipo II.⁹⁵ Sin embargo, la presencia de $O_2(^3\Sigma_g)$ es fundamental para que cualquiera de los dos procesos tengan lugar y, ambientes de hipoxia pueden poner en riesgo la eficacia de la PDI.⁶⁵

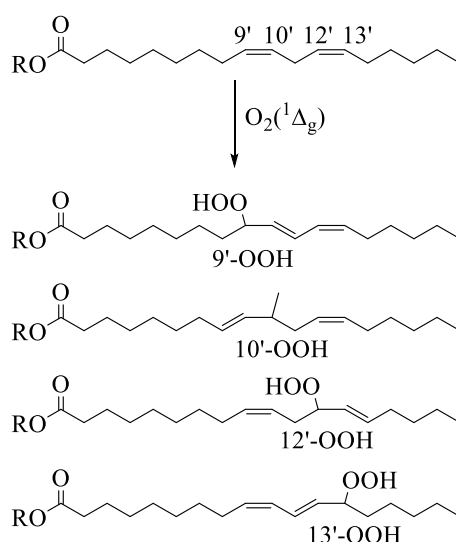
1.1.7. Reacciones del oxígeno singlete

Las reacciones entre el $O_2(^1\Delta_g)$ y los dobles enlaces de estructuras macromoleculares cíclicas, pueden dividirse en tres categorías de reacciones de adición.⁷² La primera es la reacción eno, mediante la cual el $O_2(^1\Delta_g)$ se añade a un carbono de un doble enlace, desplazando el mismo a un carbono vecino y formando un hidroperóxido.⁹⁸ En segundo lugar, el $O_2(^1\Delta_g)$ puede participar en cicloadiciones de Diels-Alder, dando como resultado la formación de endoperóxidos puenteados.⁹⁹⁻¹⁰⁰ El tercer tipo, es la adición del $O_2(^1\Delta_g)$ a un doble enlace carbono-carbono para formar un anillo inestable de 1,2-dioxetano.⁷²

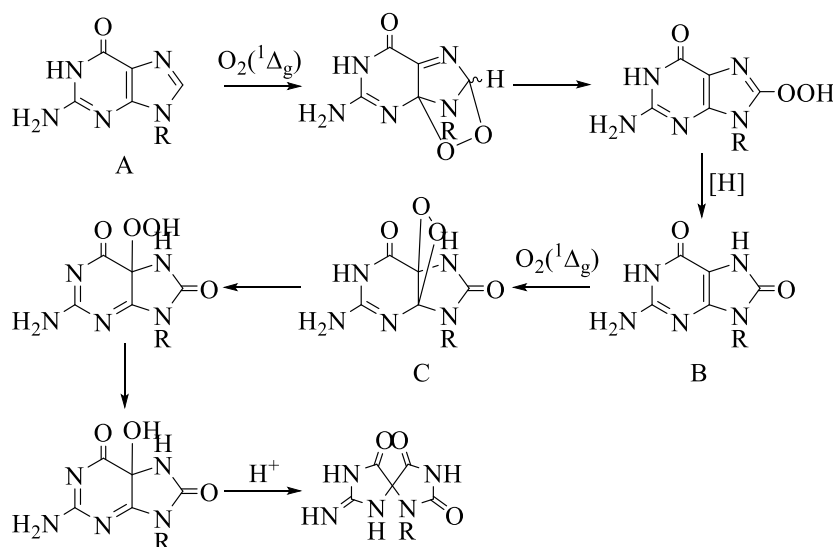
El $O_2(^1\Delta_g)$ puede reaccionar con las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos, específicamente con tirosina, histidina y triptófano. Además, reacciona con los aminoácidos cisteína y metionina para formar varios sulfóxidos debido a las relativamente altas densidades de electrones que poseen los restos de azufre.¹⁰¹ El $O_2(^1\Delta_g)$ también puede conducir a la extensa carbonilación de proteínas y es responsable de la destrucción de grupos prostéticos (por ejemplo, el hemo en la catalasa).¹⁰²⁻¹⁰³ También, lleva a cabo reacciones de tipo eno con lípidos insaturados para formar hidroperóxidos. Reacciona con el colesterol para dar lugar a hidroperóxidos,¹⁰⁴ y con componentes del ácido desoxirribonucleico (ADN), particularmente con guanina y timina (nucleósidos de purina) para producir endoperóxidos inestables y altamente reactivos.¹⁰⁵ Todas estas reacciones, inducen daños en ciertas

biomoléculas, lo que conlleva a una pérdida de sus funciones biológicas conduciendo a la inactivación celular.¹⁰⁶

En el **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestra la reacción entre el $O_2(^1\Delta_g)$ y el ácido linoleico.¹⁰⁷ Este proceso de peroxidación de lípidos se lleva a cabo a través de una reacción eno que da lugar a la formación de un hidroperóxido alílico, con un cambio concertado de un doble enlace. El $O_2(^1\Delta_g)$ puede agregar el grupo funcional –OOH en las posiciones 9', 10', 12' o 13'.¹⁰⁸⁻¹⁰⁹ En el Esquema N°7 se observa el mecanismo de oxidación de la guanina a través de una reacción de cicloadición [2+4] producida por el $O_2(^1\Delta_g)$, que da como producto final 8-oxoG (B).¹¹⁰ Este último compuesto, también es susceptible a la oxidación con $O_2(^1\Delta_g)$ dando lugar a la formación del dioxetano (C) por medio de una reacción de cicloadición [2+2].



Esquema N°6. Peroxidación del ácido linoleico mediada por $O_2(^1\Delta_g)$.

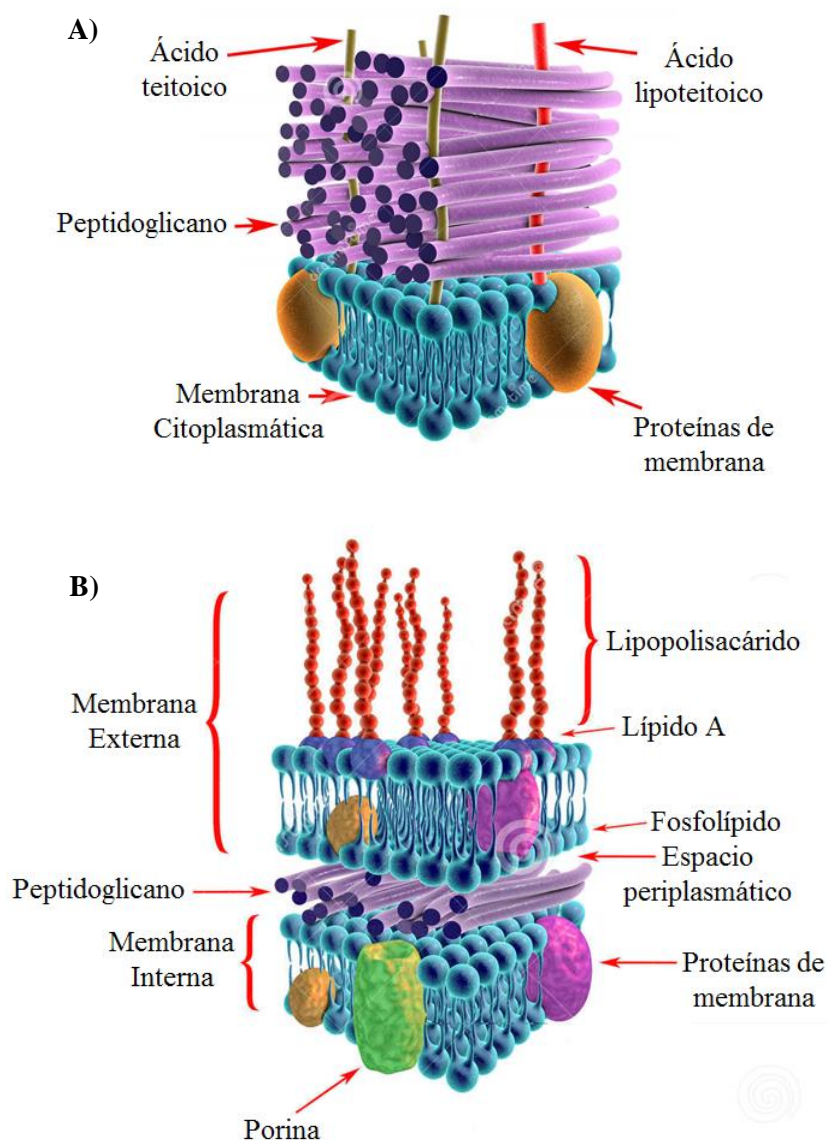


Esquema N°7. Mecanismo de fotooxidación de guanina.

1.2. Bacterias

1.2.1. Gram positivas y Gram negativas

Las células microbianas presentan una gran variedad de tamaño, arquitectura subcelular y composición bioquímica. Como consecuencia, la susceptibilidad a los procesos de fotosensibilización puede ser significativamente diferente en función del microorganismo a tratar. Las células bacterianas se pueden dividir en dos grupos que poseen grandes diferencias en su estructura y organización celular: bacterias Gram positivas y Gram negativas (Esquema N°8).⁷⁰



Esquema N°8. Membrana y pared celular de (A) bacterias Gram positivas y (B) Gram negativas.

Las bacterias Gram positivas, están rodeadas por una pared exterior separada de la membrana plasmática por un espacio periplásmico. La pared gruesa de entre 20-80 nm

representa una malla protectora constituida principalmente por capas de peptidoglicano, que son atravesadas por ácidos lipoteicoicos y teicoicos cargados negativamente estando los primeros anclados en la membrana citoplasmática (Esquema N°8A).¹¹¹ Por lo tanto, la pared exterior posee un alto grado de porosidad que le permite a los fotosensibilizadores más comúnmente utilizados, difundir fácilmente hacia la membrana plasmática interna.¹¹² Se han encontrado varias macromoléculas con un peso molecular de hasta aproximadamente 60.000 g/mol que pueden atravesar fácilmente la pared para llegar a la membrana interna.^{111, 113} Por lo tanto, los agentes fotosensibilizadores más comunes, cuyo peso molecular generalmente no es superior a 1500 g/mol, pueden cruzar rápidamente la pared exterior y localizarse en el entorno inmediato de los sitios endocelulares fotosensibles.⁷⁰

Por otro lado, las bacterias Gram negativas se caracterizan por la presencia de una membrana externa organizada de entre 10-15 nm de espesor que se encuentra del lado externo de la red de peptidoglicano, cuyos componentes (lipoproteínas, lipopolisacáridos (LPS), proteínas con función porina) proporcionan a la superficie exterior un cuasi-continuo de cargas negativas que están parcialmente neutralizadas por los cationes divalentes Mg^{2+} y Ca^{2+} (Esquema N°8B).¹¹⁴ La molécula fotosensibilizadora es más grande que los cationes, esto hace que la estructura del lipopolisacárido se distorsione y permita al fotosensibilizador unirse y/o penetrar en la membrana externa más fácilmente.⁷² El sistema de pared y membrana celular de las bacterias Gram negativas, altamente organizado, inhibe la penetración de los compuestos con un peso molecular mayor a 600-700 g/mol.¹¹⁴⁻¹¹⁶ La fotosensibilización de estas bacterias puede aumentarse utilizando compuestos con cargas positivas intrínsecas. Estos agentes catiónicos interactúan fuertemente con los sitios cargados negativamente de la superficie externa de las bacterias Gram negativas incrementando la eficiencia de los procesos fotodinámicos.⁶²

Sobre la base de las consideraciones mencionadas anteriormente, las bacterias Gram negativas son el objetivo más desafiante para cualquier tipo de tratamiento antimicrobiano. En general, los estudios *in vitro* con microorganismos, indican que las bacterias Gram positivas son susceptibles al efecto producido por una gran variedad de fotosensibilizadores, mientras que las Gram negativas son resistentes a la acción de agentes neutros y aniónicos.¹²

El objetivo más frecuente en PDI cuando se emplean fotosensibilizadores tales como fenotiazinas, porfirinas o ftalocianinas, parece ser la membrana citoplasmática.⁷⁰ Una serie de observaciones experimentales directas e indirectas apoyan este hecho.¹¹⁷⁻¹¹⁹ Sin embargo, el proceso general de inactivación es de naturaleza de objetivos múltiples, es por ello, que a las células microbianas les es difícil desarrollar estrategias de protección. Por lo tanto hasta

el día de hoy, no han aparecido cepas que muestren resistencia a la inactivación fotodinámica.⁷⁰ Estudios de inactivación fotodinámica de *Vibrio fischeri* y *E. coli* con el fotosensibilizador 5,10,15-tris(1-metilpiridinio-4-il)-20-(pentafluorofenil)-porfirina (Tri-Py⁺-Me-PF) ponen de manifiesto que las bacterias no desarrollan resistencia a la PDI.¹²⁰ Los mismos tipos de ensayos se llevaron a cabo con el virus T4 y no se observó resistencia a la PDI luego de 10 ciclos consecutivos.¹²¹

En varios casos, las infecciones son causadas por una flora microbiana heterogénea. Por lo tanto, el protocolo aprobado para el tratamiento de estas infecciones no se puede enfocar en un solo tipo de patógeno, sino que debe caracterizarse por actuar de manera eficaz en contra de un amplio espectro de microorganismos con muy diferentes características biológicas, morfológicas y fisiológicas.^{70, 122}

1.2.2. *Staphylococcus aureus*

S. aureus se incluye dentro de la familia *Micrococcaceae* y del género *Staphylococcus*.¹²³ Son células esféricas Gram positivas, inmóviles, no esporuladas y usualmente catalasa positivas. Poseen un diámetro que varía de 0,5 a 1,5 μm . Se disponen de a pares, tétradas o en racimos irregulares (Figura N°1). Son anaerobios facultativos que producen ácidos a partir de glucosa, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. La temperatura óptima de crecimiento de *S. aureus* es entre 30-37 °C.¹²³ En medios sólidos las colonias típicas se presentan como circulares, lisas, mantecosas, redondas, ligeramente convexas y con un diámetro de 1 a 4 mm.¹²⁴ Estos microorganismos son relativamente resistentes a la desecación y por ello fácilmente dispersables por las partículas de polvo a través del aire y de las superficies. Soportan elevadas temperaturas (hasta 50 °C durante 30 min) y altas concentraciones de cloruro de sodio.¹²⁴⁻¹²⁵

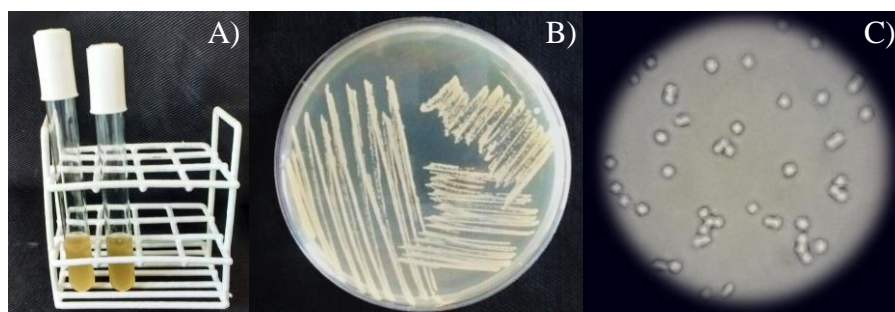


Figura N°1. Cepa de *S. aureus* ATCC 25923. (A) Cultivo en caldo tripticasa soya después de un crecimiento durante toda la noche (*Overnight*, ON). (B) Colonias circulares características de *S. aureus* creciendo sobre placa de agar tripticasa soya. (C) Imagen al microscopio óptico de *S. aureus*, 100x.

S. aureus se encuentra en la flora bacteriana de la piel, la cavidad oral y el tracto respiratorio superior. Se estima que el 20% de la población humana está colonizada por esta bacteria, pero no presentan signos o síntomas de infección.¹²⁶ *S. aureus* es un patógeno potencial y los individuos colonizados asintomáticos pueden transmitir la bacteria de una persona a otra, ya sea por contacto directo o a través de superficies colonizadas.¹²⁷

Este microorganismo es el principal causante de infecciones bacterianas en humanos de todo el mundo.¹²⁸ La gravedad puede ir desde infecciones en la piel hasta una neumonía necrotizante mortal. El mayor inconveniente que presenta este patógeno es la capacidad de adquirir resistencia a los antibióticos,¹²⁹ lo cual es desconcertante porque los fármacos son cruciales para el tratamiento de muchos tipos de infecciones bacterianas. Hacia el año 1940, *S. aureus* era uniformemente sensible a la penicilina.¹³⁰ Sin embargo en el año 1970, más del 90% de las cepas provenientes de la comunidad habían adquirido resistencia a este antibiótico. La primera cepa resistente a la meticilina se informó en 1968 en Estados Unidos.¹³¹⁻¹³² Su frecuencia fue aumentando año tras año hasta que en la actualidad, el desarrollo de cepas resistentes ocurre en hospitales de todo el mundo y causa una importante morbilidad y mortalidad.¹³³ Estudios experimentales han demostrado que *S. aureus* resistente a la meticilina,¹³⁴ sobrevive entre 12-60 días en los objetos inanimados de los hospitales lo que favorece la disipación de este microorganismo.^{78, 135}

Por lo tanto, es imperativo proporcionar perspectivas para la profilaxis y para el desarrollo de nuevos tratamientos destinados a erradicar infecciones producidas por *S. aureus*. En este sentido, la inactivación fotodinámica ha sido propuesta como una alternativa para el control de infecciones bacterianas.¹⁷

S. aureus puede producir un cierto número de porfirinas endógenas, predominantemente protoporfirina IX (PpIX), a través de una variante de la vía normal de biosíntesis del grupo hemo.¹³⁶⁻¹³⁷ Trabajos previos han demostrado que MRSA y otros microbios de importancia médica, pueden ser ópticamente inactivados utilizando luz azul ($\lambda=400-420$ nm).¹³⁸⁻¹³⁹ Sin embargo, esto es posible empleando elevadas dosis de luz lo que puede afectar en gran medida a las células huésped, disminuyendo la selectividad del tratamiento.¹⁴⁰

1.2.3. *Escherichia coli*

E. coli es probablemente el microorganismo mejor conocido del mundo, ya que se ha utilizado como modelo en numerosas investigaciones científicas para estudiar todo tipo de

aspectos genéticos y fisiológicos. Su genoma entero se conoce desde hace algunos años y su biología general está bien estudiada.¹⁴¹⁻¹⁴²

E. coli es un bacilo Gram negativo típico de la familia *Enterobacteriaceae* (Figura N°2), la misma que incluye a otras bacterias patógenas de humanos como son *Shigella*, *Salmonella* y *Klebsiella*. Esta familia de bacterias está constituida por bacilos no esporulados, que fermentan y oxidan la glucosa, carecen de indofenol oxidasa, reducen los nitratos a nitritos y se hayan ampliamente distribuidos en la naturaleza.¹⁴³ En cultivos jóvenes se pueden observar formas cocobacilares y hasta cocoides. El tamaño promedio de la mayoría de estas bacterias oscila entre 0,5 y 2 μm de ancho y de 2 a 4 μm de largo. La temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de sus especies es de 37°C aunque *E. coli* puede resistir hasta 42°C.¹⁴³ El requerimiento de nutrientes en el metabolismo de esta bacteria no es altamente exigente y crecen de manera similar en todos los medios empleados. Las colonias son relativamente grandes, de aspecto húmedo y de bordes definidos.¹⁴³

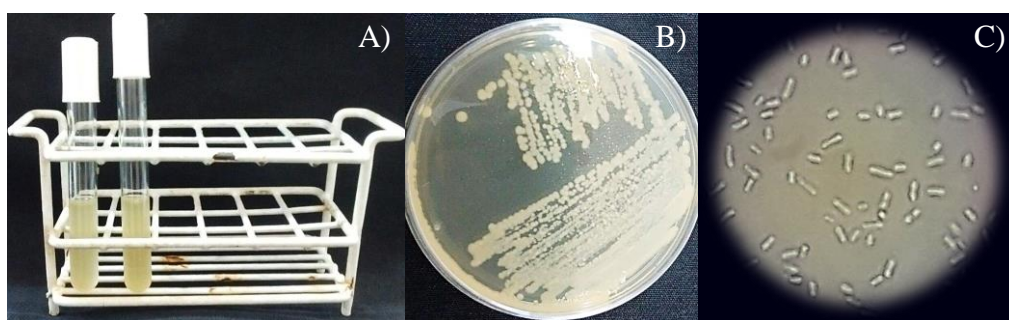


Figura N°2. Cepa de *E. coli* EC7. (A) Cultivo en caldo tripticasa soya después de un crecimiento durante toda la noche (*Overnight*, ON). (B) Colonias características de *E. coli* creciendo sobre placa de agar tripticasa soya. (C) Imagen al microscopio óptico de *E. coli*, 100x.

La bacteria *E. coli* tiene como hábitat el intestino del hombre y de los animales, donde son capaces de respirar anaeróbicamente, mientras que otras pueden parasitar plantas o ser comensales de animales invertebrados y vertebrados (vida saprofítica), donde respiran aeróbicamente. En particular, *E. coli* produce ácido y gas en presencia de lactosa y al no ser una bacteria fijadora, requiere nitrógeno soluble como el sulfato de amonio.¹⁴⁴

Este microbio es el principal habitante facultativo que integra la flora normal, por cuanto también es el patógeno humano aislado con mayor frecuencia como agente causal de infecciones de las vías urinarias y de heridas, de afecciones respiratorias, meningitis y septicemia. Ciertas cepas de *E. coli* también son patógenos intestinales importantes que causan una amplia variedad de enfermedades gastrointestinales.¹⁴

Un avance importante en la ciencia de los años sesenta, fue la introducción de penicilinas sintéticas y de cefalosporinas activas para el tratamiento de infecciones producidas por *E. coli*.¹⁴⁵ Algunos ejemplos de estas son ampicilina, amoxicilina y cefalotina. Sin embargo, la eficacia de estos fármacos disminuyó drásticamente con la diseminación de plásmidos (moléculas de ADN extracromosómico con genes de resistencia a determinados antibióticos) que codifican las β -lactamasas, enzimas capaces de hidrolizar rápidamente los fármacos antes mencionados.¹⁴⁵ Para contrarrestar este problema, en la década de 1980, se introdujeron cefemas de espectro extendido que son cefalosporinas de tercera generación. Pero al poco tiempo, la bacteria *E. coli* desarrolló resistencia a estos nuevos antibióticos, al generar plásmidos que producían derivados de las llamadas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) que adquirieron especificidad por cada sustrato ampliada. Por ejemplo, un tipo común de enzima, la CTX-M-15, hidroliza la cefotaxima (un agente de tercera generación) mucho más rápido que a la cefalotina (compuesto de primera generación). Cabe destacar, que ha habido un aumento constante en la resistencia de *E. coli* a distintos fármacos de diferentes generaciones de antibióticos.¹⁴⁵ Es por ello, que es necesario buscar terapias alternativas para hacerle frente a esta situación que pone en riesgo la vida de las personas en todo el mundo. Además, es necesario tomar conciencia de las prácticas médicas que se desarrollan en la actualidad, que son una responsabilidad tanto de las personas dedicadas a las ciencias médicas, como de los pacientes que reciben los tratamientos (sección 1.1.2).

1.2.4. Biopelículas bacterianas

Las biopelículas bacterianas o *biofilms* en inglés, son la forma de vida de los microbios más extendida en la naturaleza. Se encuentran en ecosistemas naturales y artificiales, crecen sobre las rocas, en los caños de cualquier metal que conducen agua u otros líquidos, en el forraje que consumen los ruminantes, los cálculos renales, los huesos infectados, las placas dentales, los lentes de contacto y hasta son culpables del mal aliento. La mayoría de las bacterias cuando no cuentan con suficientes nutrientes en el medio que los rodea crecen como biopelículas.¹⁴⁶

Las biopelículas pueden definirse como comunidades bacterianas adheridas irreversiblemente a una superficie viva o inerte, a una interfase o entre ellas, englobadas en una matriz de polisacáridos producida por ellas, y que presentan un fenotipo alterado con respecto a la velocidad de crecimiento y la transcripción de genes.¹⁴⁷

Las biopelículas tienen formas características y reconocibles al microscopio electrónico de barrido, los cuales consisten básicamente en bacterias encerradas en una matriz de exopolisacáridos atravesada por pequeños canales que permiten la circulación de agua, nutrientes, oxígeno y secreciones a través de él (Figura N°3).¹⁴⁸ Aunque la composición de las biopelículas es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario de las biopelículas bacterianas es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua, células bacterianas y exopolisacáridos, posee en menor cantidad otras macromoléculas como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias.¹⁴⁹ La existencia de canales en toda la biopelícula bacteriana no evita sin embargo, que dentro del mismo se puedan encontrar ambientes diferentes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno es distinta. Esta circunstancia aumenta la heterogeneidad sobre el estado fisiológico en el que se encuentra la bacteria dentro de las biopelículas y dificulta su estudio.¹⁴⁹

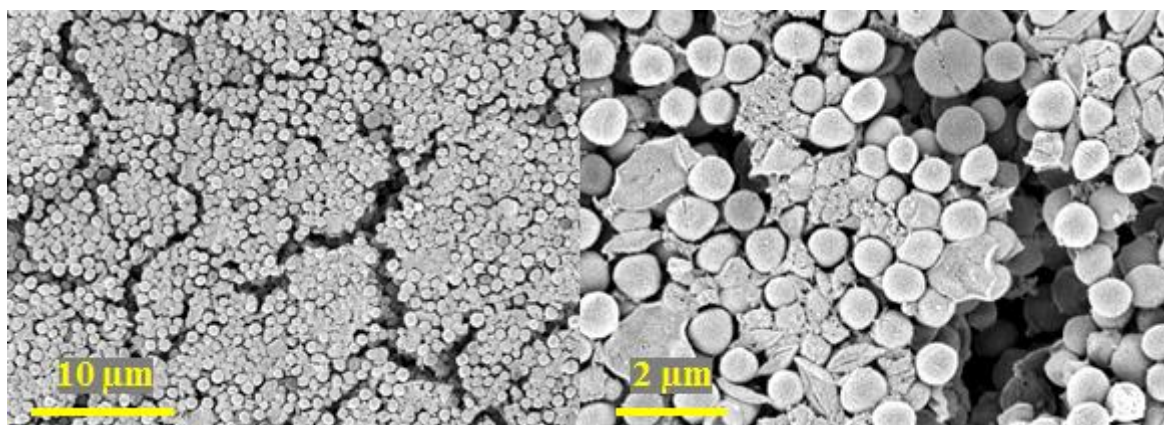


Figura N°3. Microscopía electrónica de barrido de biopelículas de *S. aureus* creciendo sobre vidrios dopados con óxido de indio y estaño.

La formación de biopelículas es un ejemplo de comportamiento grupal que es coordinado a través del sistema de *quorum sensing*. Éste es un mecanismo de regulación dependiente de la acumulación en el medio ambiente de una molécula señal, que permite a la bacteria sentir la densidad de población existente. En bacterias Gram negativas el principal autoinductor es acilhomoserina lactona, mientras que en bacterias Gram positivas son péptidos. Cuando en el medio extracelular se acumula una suficiente cantidad del autoinductor, éste activa un receptor específico que altera la expresión de genes afectando a distintos caracteres.¹⁵⁰ En una etapa posterior la bacteria comienza a secretar un exopolisacárido que constituye la matriz de las biopelículas. Algunas células de la misma se

liberan para colonizar nuevas superficies cerrando el proceso de desarrollo de formación de biopelículas.¹⁴⁹

En las biopelículas las bacterias difieren profundamente de las formas planctónicas o flotantes libres. Estas últimas conservan este fenotipo aun cuando crecen como colonias sobre una superficie de agar. Además son las que producen las infecciones agudas y que pueden combatirse con los métodos tradicionales de la microbiología: fagocitos, anticuerpos, vacunas y antibióticos. En cambio, las biopelículas están implicadas en infecciones crónicas, lentas y resistentes a los tratamientos. En la clínica ellos se forman en las superficies de tejidos naturales e implantes artificiales como válvulas cardíacas, prótesis, catéteres, cánulas, derivaciones ventrículo-peritoneales, dispositivos intrauterinos y tubos endotraqueales, los cuales son colonizados principalmente por cepas de *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* y otros patógenos oportunistas (Figura N°3B).¹⁵¹⁻¹⁵²

La vida de la bacteria en una biopelícula bacteriana ofrece muchas ventajas, entre ellas proporciona resistencia a condiciones ambientales desfavorables, así como aumenta la tolerancia frente a un antimicrobiano, la protección contra la depredación y la oportunidad de la transferencia horizontal de genes, por lo que es considerado un factor importante de virulencia en cepas patógenas.¹⁵³ Además, la alta densidad celular que se genera en estas estructuras otorga ventajas para realizar determinados procesos que la célula individual no puede realizar, como la producción de metabolitos o exoenzimas.¹⁵⁴

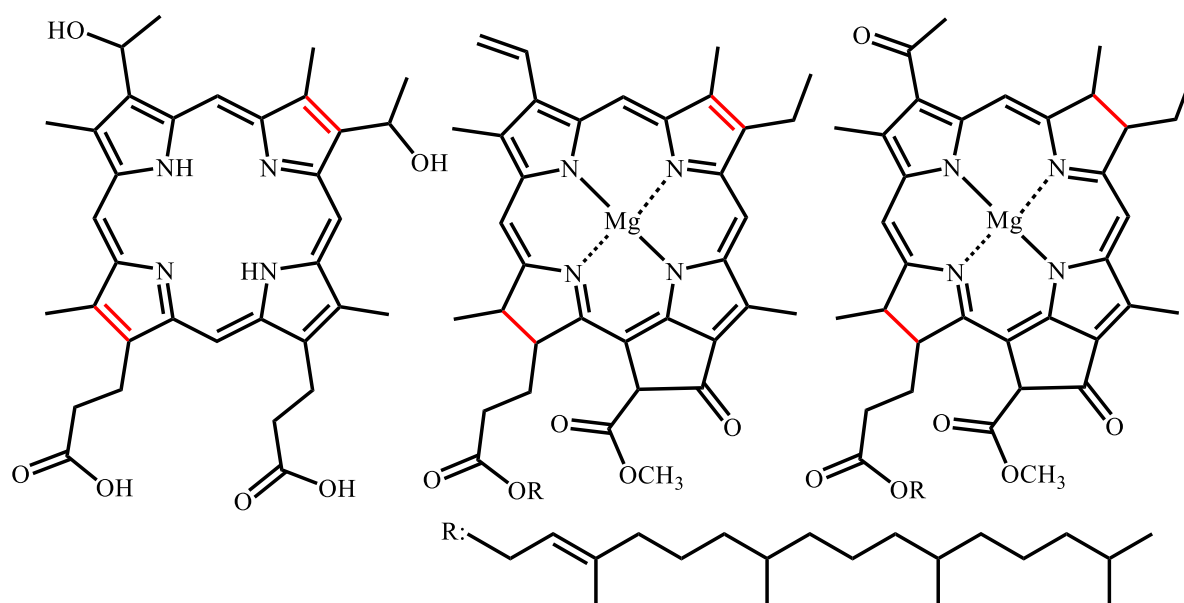
Las biopelículas juegan un triple rol en la propagación de la resistencia a antibióticos. Primero, el tratamiento de infecciones relacionadas a biopelículas requiere una terapia antibiótica de larga duración (y a menudo recurrente). Es por ello, que las bacterias colonizadoras se exponen a la droga durante un tiempo lo suficientemente largo como para adquirir una resistencia específica. En segundo lugar, la fisiología de la biopelícula le permite a las bacterias integrarse y sobrevivir a la exposición prolongada de antibióticos. Concentraciones sub-inhibitorias del antibiótico inducen la producción de matriz polimérica y promueve aún más la supervivencia de la biopelícula.¹⁵⁵ Finalmente, la alta densidad celular aumenta la competencia genética y la acumulación de elementos genéticos móviles en las biopelículas, proporcionando un escenario ideal para una eficiente transferencia horizontal de genes.¹⁵⁶

Los microorganismos de la biopelícula son muy difíciles de tratar con agentes antimicrobianos y la liberación de bacterias desde ésta puede provocar una infección, sobre todo si el paciente está inmunocomprometido.¹⁴⁹ En el futuro inmediato el pronóstico para el tratamiento y erradicación de las biopelículas no es muy alentador. Los agentes

antimicrobianos, además de poder ser inefectivos por el desarrollo de resistencia del microorganismo, pueden ser difíciles de mantener a la concentración terapéutica en el sitio blanco, y al aumentar estas cantidades puede resultar tóxico para el huésped. Por estas razones es necesario el desarrollo de nuevas drogas y metodologías antibióticas.^{70, 157} Una de las modalidades antimicrobianas propuestas es la PDI de microorganismos.⁶²

1.3. Fotosensibilizadores

Los fotosensibilizadores basados en macrociclos aromáticos, se clasifican en generaciones en función del orden en el cual fueron descubiertos, de sus propiedades espectroscópicas y de su estructura molecular. Cabe destacar que esta clasificación se ha llevado a cabo para fotosensibilizadores destinados a PDT, sin embargo en ciertas ocasiones, también se emplea para moléculas usadas en PDI. El grupo hematoporfirina (Esquema N°9) y sus derivados, constituyen los fotosensibilizadores de primera generación.¹⁵⁸ Estos fueron descubiertos durante el estudio de la causa del síndrome de fotosensibilidad ocasionado por porfirias.¹⁵⁹



Esquema N°9. Estructura molecular de: (A) hematoporfirina, (B) clorofila y (C) bacterioclorofila.

Los fotosensibilizadores de segunda generación son aquellos que presentan bandas de absorción entre 650-850 nm donde los cromóforos biológicos normalmente no absorben luz. Las clorofilas y las bacterioclorofilas pertenecen a esta familia de compuestos y sus estructuras se muestran en el Esquema N°9. Así, en función de las propiedades de absorción de los cromóforos biológicos presentes en los seres vivos, como lo son el grupo hemo en la hemoglobina y la dispersión de la luz ocasionada por la melanina, queda definida la ventana

fototerapéutica (Figura N°4). Finalmente, los fotosensibilizadores de tercera generación derivan de los de segunda generación, a los cuales se les ha introducido o unido covalentemente, ciertas estructuras químicas que le permiten al fotosensibilizador llegar al sitio objetivo. Algunos ejemplos consisten en la unión de aminoácidos, polímeros, proteínas, carbohidratos o anticuerpos. Es así, que estos compuestos son más eficientes que los de segunda generación dada la alta especificidad biológica que presentan.¹⁶⁰

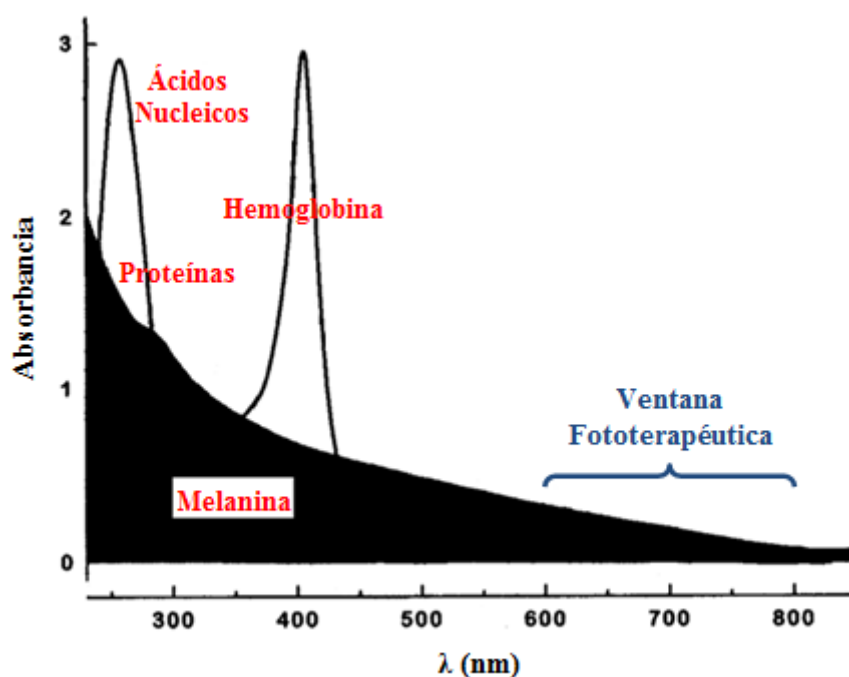


Figura N°4. Espectros de absorción de cromóforos biológicos presentes en el cuerpo humano. Adaptado de referencia 160.

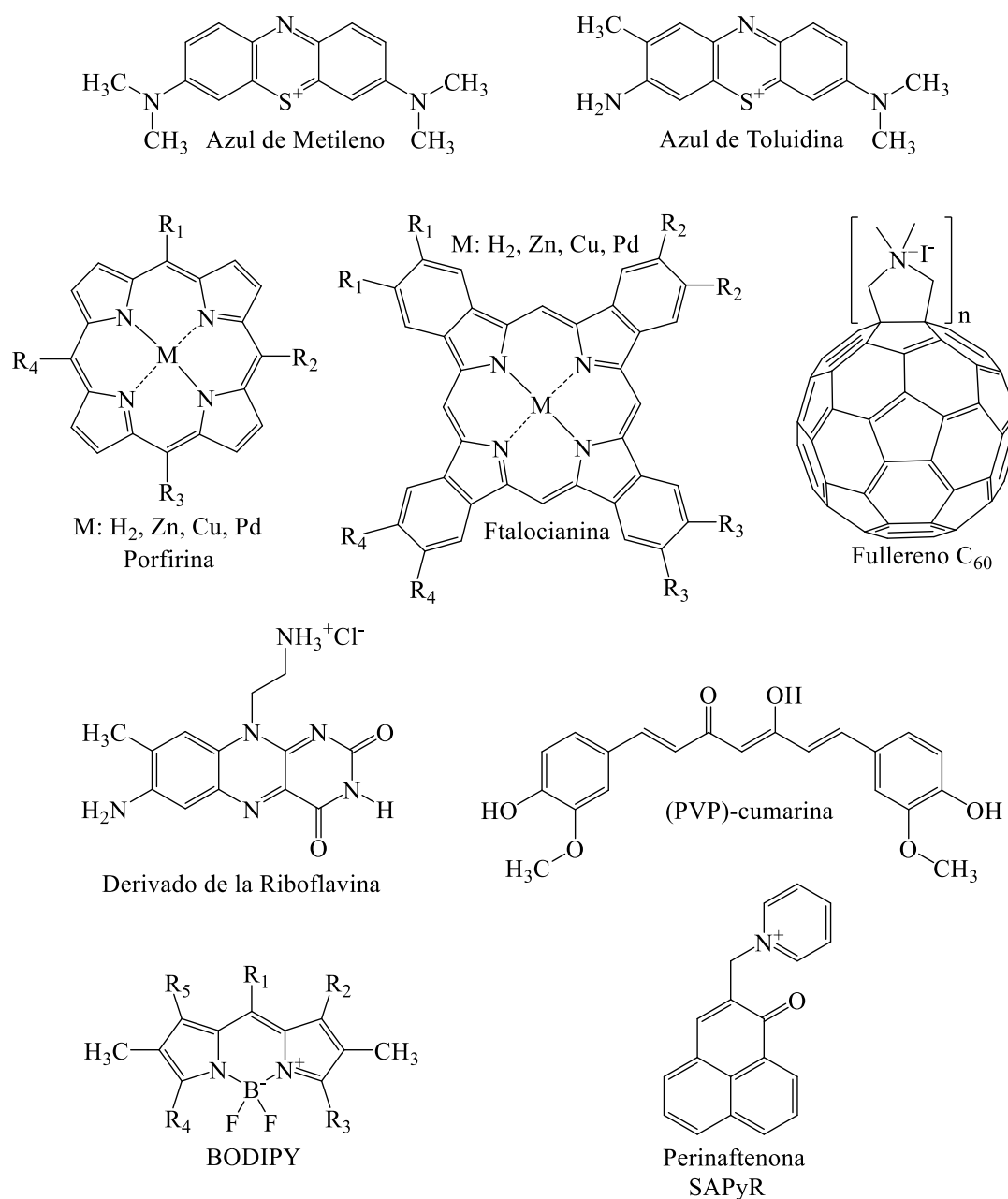
Varios agentes fotosensibilizadores producen una inactivación eficaz de al menos una clase de patógeno microbiano y muchos de ellos no derivan de macrocilos aromáticos (Esquema N°10).^{71, 75, 112, 161-163} El azul de metileno y de toluidina son dos de los fotosensibilizadores más antiguos empleados para la PDI resultando eficientes para matar un amplio rango de microorganismos. Estas pertenecen a la familia de las fenotiazinas y se caracterizan por una estructura aromática heterocíclica.¹⁶⁴ Para volver a estas moléculas más eficientes para la PDI, se han realizado diferentes modificaciones químicas en sus estructuras a través de distintas metodologías de síntesis.¹⁶⁵⁻¹⁶⁶ Otra familia de compuestos empleados para la PDI, son los macrociclos aromáticos como las porfirinas (primera generación) y las ftalocianinas (segunda generación). Estas moléculas han demostrado ser muy eficientes para erradicar microorganismos siempre y cuando estén cargadas positivamente.¹⁶⁵ Además, cuando poseen el metal zinc coordinado en su estructura, su eficacia se ve aumentada debido a un efecto de átomo pesado que produce un aumento en Φ_T y por lo tanto en Φ_Δ .¹⁶⁷ También

se han estudiado moléculas con estructuras muy similares a las porfirinas llamadas clorinas y bacterioclorinas, las cuales tienen altos coeficientes de extinción molar en la región visible del espectro electromagnético y un mayor número de enlaces saturados.^{162, 168} Otra clase de compuestos interesantes son los fullerenos, los cuales son efectivos cuando se funcionalizan con grupos hidrofílicos y catiónicos.¹⁶⁹⁻¹⁷¹ Por otro lado, las perinaftenonas también se han empleado para la PDI, las cuales son cetonas aromáticas con rendimientos de producción de $O_2(^1\Delta_g)$ cercanos a la unidad, por lo que actúan predominantemente mediante un mecanismo de acción fotodinámico tipo II.¹⁷² Dentro de esta familia de compuestos, la estructura molecular mostrada en el Esquema N°10 ha sido muy eficiente para la erradicación de biopelículas de microorganismos patógenos.¹⁶⁵ Distintos derivados de la riboflavina (vitamina B2) también han sido empleados para la PDI dado que se activan con luz ultravioleta para generar ROS.¹⁷³ Esta clase de moléculas, se han estudiado para inactivar bacterias creciendo en la sangre.¹⁷³ Otro fotosensibilizador obtenido de la naturaleza es la cumarina, molécula que actúa como metabolito secundario en un grupo reducido de plantas. Debido a su baja solubilidad en agua, estas moléculas han sido modificadas mediante síntesis orgánica y de esta manera se obtuvieron compuestos con un alto contenido de grupos oxidrilos.¹⁷⁴ Finalmente, un fotosensibilizador que está siendo ampliamente estudiado en la actualidad, es el borodipirrometeno más conocido como BODIPY.¹⁷⁵⁻¹⁷⁶ Esta clase de compuestos, pueden generar ROS mediante los dos mecanismos de acción fotodinámicos y la prevalencia de uno u otro va a depender de las modificaciones estructurales que se les realicen.¹⁷⁷ Poseen altos rendimientos de fluorescencia por lo que su uso más común es como fluoróforo.¹⁷⁸⁻¹⁷⁹ En el anexo de esta tesis doctoral, se presenta la síntesis de BODIPYs destinados a la PDI de microorganismos.

Sobre la base de la experiencia desarrollada hasta el momento y las consideraciones sobre las características bioquímicas y morfológicas de las células microbianas, es posible mencionar ciertas propiedades que permiten que un fotosensibilizador antimicrobiano actúe de manera óptima.^{17, 180} A continuación se van a desarrollar las propiedades que debe reunir un fotosensibilizador de modo detallado y clasificado.

Síntesis del fotosensibilizador

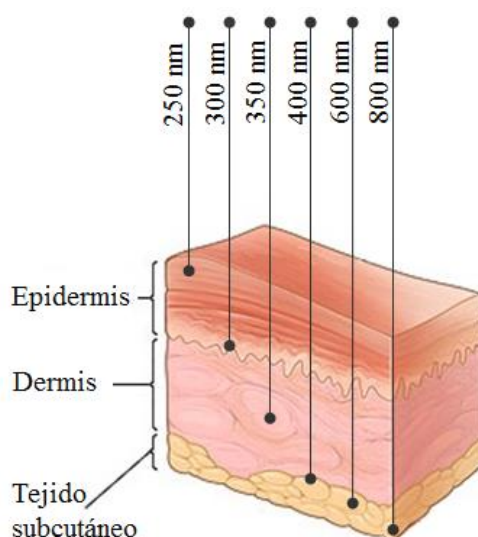
- ✓ Un proceso de síntesis reproducible.
- ✓ Alta pureza química.



Esquema N°10. Estructuras moleculares de los fotosensibilizadores empleados para la PDI.

Características fotoquímicas

✓ Un alto coeficiente de extinción molar (ϵ , $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en aquellas longitudes de onda a las cuales la luz penetra más profundamente en los tejidos, que es llamada la ventana fototerapéutica (600-800 nm) (Figura N°4). En el Esquema N°11 se muestra cuanto penetra la luz a los tejidos en función de la longitud de onda de la luz incidente. Para erradicar infecciones superficiales, la luz azul (400-420 nm) intensamente absorbida pueden ser muy útil.^{65, 71}



Esquema N°11. Penetración de la luz en los tejidos. Adaptado de referencia 181.

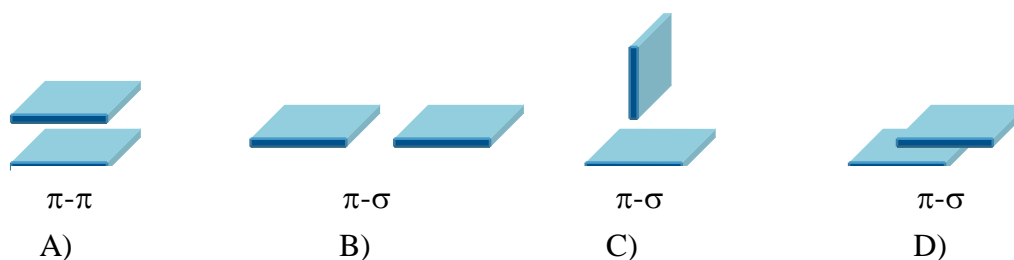
- ✓ Un tiempo de vida largo del estado excitado triplete ($\tau^3 > 1\mu\text{s}$) para producir eficientemente ROS.¹⁸²
- ✓ Un alto rendimiento cuántico de formación de triplete (Φ_T) para favorecer la generación de ROS.^{65, 183}
- ✓ Energía del estado excitado triplete apropiada ($E_T > 95 \text{ kJ/mol}$) para transferir eficientemente la energía al estado fundamental del oxígeno molecular.¹⁸⁴
- ✓ Fotoestabilidad adecuada. El efecto fotodinámico puede ser incompleto si el fotosensibilizador se descompone rápidamente. Sin embargo, la degradación del mismo con la luz permite eliminarlo del organismo del huésped o del medio.⁶⁸

Estas características fotofísicas varían en función de los sustituyentes que se le agreguen a los fotosensibilizadores sintetizados y con la formación de complejos con distintos metales.¹⁸⁵⁻¹⁸⁶

Solubilidad

El fotosensibilizador debe encontrarse en la célula en estado monomérico principalmente. Si la molécula está agregada, disminuye su capacidad para producir un daño fotodinámico principalmente porque desciende el Φ_A .¹⁸⁷⁻¹⁸⁹ Uno de los principales problemas encontrados en la utilización de macrociclos tetrapirrólicos es la formación de agregados. Estos se forman cuando disminuye la solubilidad del fotosensibilizador, es decir cuando las interacciones intermoleculares de soluto son energéticamente más favorables que las interacciones entre moléculas de soluto y de solvente. En este contexto, la agregación

involucra asociación entre moléculas de soluto a partir de unidades individuales (monómeros), pero no la formación de enlaces covalentes. Dichos agregados pueden ser dímeros, trímeros, oligómeros o bien una mezcla de ellos. Esto conduce a la obtención de soluciones opalescentes y llegan a precipitar. En porfirinas con estructuras simples, las interacciones más importantes son las del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$.¹⁸⁷ En el Esquema N°12, se muestra las posibles geometrías involucradas en la formación de agregados de porfirinas.



Esquema N°12. Posibles geometrías de agregados de porfirinas.¹⁸⁷

La geometría A, conocida como el agregado H, puede ser estabilizada por sustituyentes polares por interacciones de van der Waals y por interacciones hidrofóbicas. Las representaciones de B y C, indican la atracción dominante de interacciones $\pi-\sigma$. La geometría D o agregado J, es común en el agregado de varias porfirinas y presenta una separación entre los macrociclos planos de 3,5-4,0 Å. En este tipo de geometría, un anillo pirrólico rico en electrones se ubica sobre otra estructura deficiente de electrones en forma paralela pero desplazada. Este tipo de geometría también corresponde a una interacción $\pi-\sigma$.¹⁸⁷ Cabe destacar que, la formación de agregados es un proceso reversible y el equilibrio es desplazado hacia la formación de los mismos por diferentes factores físicos como lo son: el descenso de la temperatura, el incremento de la concentración, el aumento de la polaridad del solvente y la disminución del impedimento estérico.¹⁸⁷

✓ Debe ser soluble en fluidos biológicos. En caso contrario, debe poder transportarse a la zona infectada utilizando algún tipo de vehículo, como por ejemplo liposomas,¹⁹⁰⁻¹⁹¹ glóbulos rojos,¹⁹² ciclodextrinas,¹⁹³⁻¹⁹⁴ nanopartículas,¹⁹⁵⁻¹⁹⁶ entre otros.

Actividad en medios biológicos

✓ Alta habilidad para producir inactivación celular inclusive a bajas dosis de luz.^{163, 197}

✓ Mínima toxicidad en ausencia de luz, lo que contribuye a la selectividad del tratamiento.^{163, 198-199}

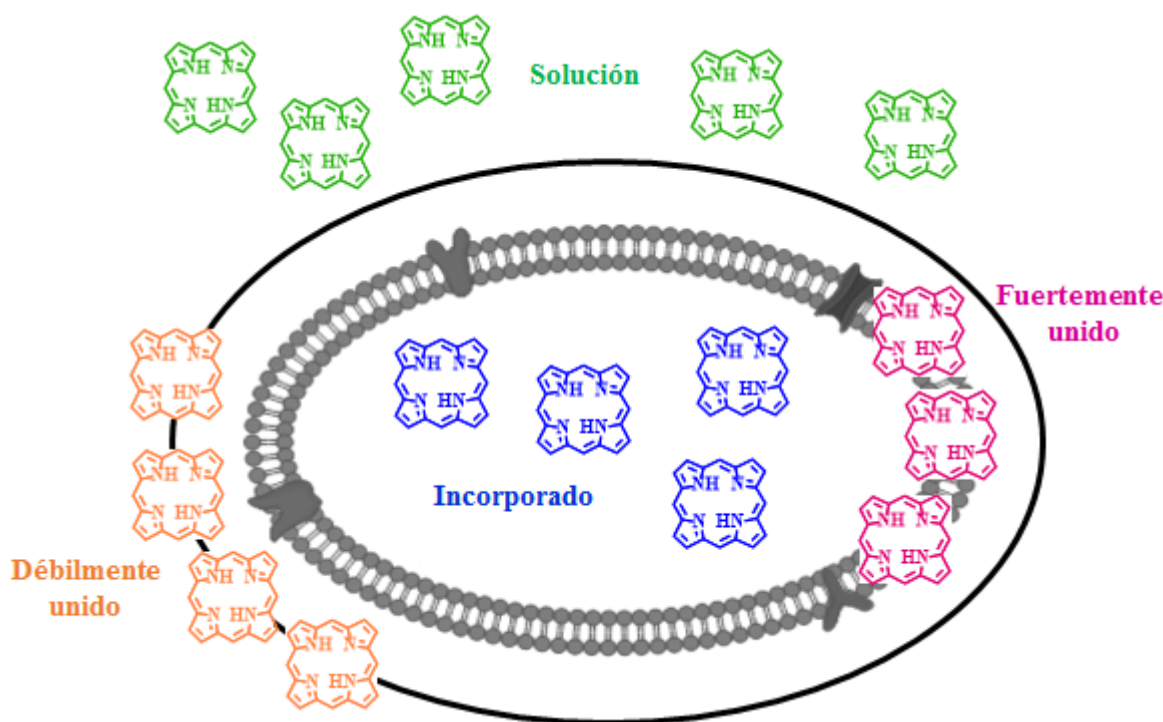
- ✓ Los mecanismos involucrados en la fotoinactivación de células no deben producir procesos mutagénicos ni dar lugar a cepas microbianas resistentes a la PDI (sección 1.1.5.).¹²⁰⁻¹²¹
- ✓ Un amplio espectro de acción sobre bacterias, hongos, levaduras, protozoos y parásitos, con el fin de producir un efecto terapéutico eficaz al tratar aquellas enfermedades infecciosas que se caracterizan por la presencia de una flora heterogénea.¹⁹⁹
- ✓ Capacidad bactericida para evitar el crecimiento de microorganismos patógenos después del tratamiento. En caso de que el fotosensibilizador sea bacteriostático o que no se haya logrado eliminar el 100% de los microorganismos, es posible repetir la PDI tras la recurrencia de la infección o combinar la terapia con antibióticos.⁶⁷

Localización del fotosensibilizador

- ✓ Un fotosensibilizador puede permanecer en solución, estar débilmente o fuertemente unido a la célula o incorporarse a la misma (Esquema N°13). Las moléculas catiónicas se ubican preferentemente en la membrana citoplasmática, principalmente debido a la atracción electrostática entre la envoltura celular de los microorganismos y los compuestos cargados positivamente que allí se ubican. La membrana contiene componentes que reaccionan con las ROS, tales como lípidos insaturados y proteínas, que serán los principales objetivos en el proceso de fotoinactivación (Sección 1.1.7.). Como consecuencia, la muerte celular será predominantemente debida a un daño en la membrana en lugar de implicar el material genético.^{70, 200-204} En la actualidad, se considera que la inteligencia de una célula está en la envoltura celular y no en su núcleo, dado que es ésta quien decide qué moléculas entran a la célula, cuáles salen y aquellas que no pasan. Es por ello, que los principales mecanismos de resistencia microbiana se crearon a nivel de envoltura celular. Una vez destruida la membrana celular ésta muere.

En el año 2005, se estudió la localización de la porfirina catiónica 5-fenil-10,15,20-tris(*N*-metil-4-piridil)porfirina (Trip[4]) en células de *Candida albicans*, mediante microscopía confocal de fluorescencia.¹¹⁷ Se encontró que el fotosensibilizador se ubica preferentemente en la envoltura celular independientemente del tiempo de incubación. Luego de la irradiación, la membrana celular se destruye y se vuelve permeable a la porfirina observándose un flujo de la molécula catiónica hacia el interior de la célula. La membrana de la vacuola resultó impermeable al fotosensibilizador.¹¹⁷ Hasta el momento, no se han realizados estudios de microscopía de fluorescencia para determinar la localización de fotosensibilizadores en bacterias Gram positivas y Gram negativas. Esto se debe a que sus

células son muy pequeñas y a que la mayoría de los fotosensibilizadores poseen bajos rendimientos de fluorescencia. Sin embargo, mediante otras metodologías experimentales, se ha demostrado que en ambos tipos de bacterias, los fotosensibilizadores se ubican preferentemente en su envoltura celular.²⁰⁰ Así Gollmer y col., presentan un método versátil basado en microscopía de fluorescencia altamente sensible que permite estudiar, en tiempo real, la incorporación de fotosensibilizadores dentro de células de *S. aureus* tras la acción fotodinámica.²⁰⁵



Esquema N°13. Diferentes localizaciones del fotosensibilizador en las células microbianas.

Con respecto a las células huésped

- ✓ Extensa mortalidad de los patógenos microbianos y que implique un daño mínimo de los constituyentes del tejido del huésped.²⁰⁶
- ✓ Mínima toxicidad en ausencia de luz para producir su acción sólo en el tejido infectado. En todos los estudios de PDI *in vitro* se llevan a cabo controles en la oscuridad para determinar la citotoxicidad de los fotosensibilizadores en estas condiciones.^{163, 171, 197} En caso de que el compuesto resulte tóxico para la célula, se disminuye la concentración en la que se aplica previo al tratamiento.
- ✓ Rápida eliminación del fotosensibilizador de los tejidos no infectados y mínima fotosensibilidad cutánea.⁷²
- ✓ Fotosensibilizadores con actividad antibacteriana que puedan interaccionar de manera específica (puente de hidrógeno, transferencia de carga, interacciones electrón dador-

aceptor) y no específica (causadas por efectos de polaridad-polarizabilidad) con el entorno biológico para que se localice de manera selectiva en la célula patógena.⁷⁰

Tipo y número de cargas

Debido a que los fotosensibilizadores que tienen una carga catiónica intrínseca resultaron capaces de fotoinactivar muchas clases de microorganismos, se concluyó que la presencia de cargas positivas es crucial para lograr efectos antimicrobianos de amplio espectro.¹² Aunque los fotosensibilizadores neutros y aniónicos son capaces de inactivar bacterias Gram positivas, las bacterias Gram negativas necesitan fotosensibilizadores con cargas positivas que les permita unirse y penetrar la barrera de permeabilidad exterior compuesta por lipopolisacáridos cargados negativamente.¹⁶⁷ Algunos estudios han demostrado que un alto número de cargas positivas hacen que el fotosensibilizador sea muy eficiente contra bacterias Gram negativas, pero un menor número de éstas son mejores para matar bacterias Gram positivas y hongos.^{169, 207} Por lo tanto, la mejor estructura para un fotosensibilizador antimicrobiano de amplio espectro, probablemente implique un cuidadoso equilibrio entre el número de cargas positivas y el carácter hidrofóbico de la molécula.²⁰⁸⁻²⁰⁹

Cabe destacar, que los grupos amino terciarios pueden representar una alternativa interesante, siempre que su fuerza básica sea lo suficientemente alta como para permitir la protonación del par de electrones libres en el átomo de nitrógeno a valores de pH neutros o fisiológicos.^{70,83, 193, 199}

Otra posibilidad es unir o encapsular una molécula de fotosensibilizador no catiónico a un vehículo cargado positivamente. Estos pueden ser ciertos polímeros, tales como: polilisina²⁰⁹ y polietilenimina.²¹⁰ También se emplean liposomas catiónicos²¹¹ y nanopartículas con cargas positivas²¹²⁻²¹⁴ entre otros nanotransportadores de fotosensibilizadores.²¹⁵

Por último, es importante subrayar que el número y la posición de los grupos cargados en una molécula, desempeña un papel importante en la modulación del curso y la eficacia del fotoproceso en contra de las células microbianas.^{70, 198}

1.3.1. Porfirinas

1.3.1.1. Propiedades generales

En los últimos años, se han propuesto una gran variedad de macrociclos derivados de porfirinas, clorinas, bacterioclorinas, ftalocianinas y porficeños como posibles agentes fototerapéuticos (sección 1.3.).^{97, 182} Particularmente, las porfirinas presentan tres ventajas

principales en su utilización: absorción en la zona visible del espectro, alta producción de $O_2(^1\Delta_g)$, estabilidad química debido a su estructura aromática y baja toxicidad en la oscuridad.^{73, 216}

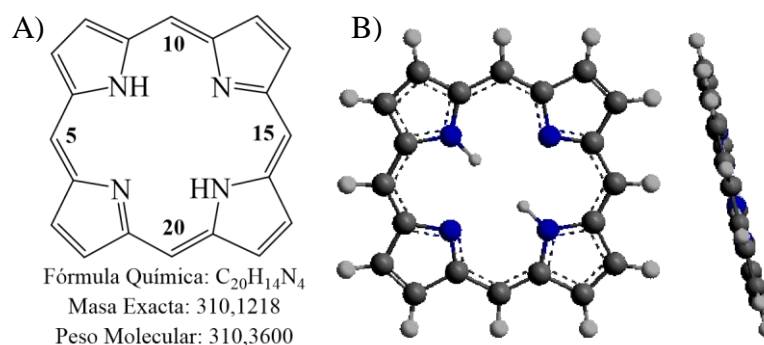
Las porfirinas son cristales de color púrpura, que al irradiarlas en solución presentan fluorescencia color roja. Sin embargo, debido a que su esqueleto básico es hidrofóbico, es necesario funcionalizarlo para mejorar su solubilidad en solventes polares.¹⁸⁶ Las porfirinas pueden ser obtenidas mediante síntesis química o a través de extracciones de productos naturales, como por ejemplo la hematoporfirina, que se obtienen de la sangre.²¹⁷

Los núcleos porfirínicos consisten en cuatro anillos del tipo pirrólico unidos por grupos metinos lo que origina un macrociclo (Esquema N°14). Las porfirinas son estructuras planas con un tamaño de aproximadamente 9 Å de diámetro y con una cavidad central de 4 Å que puede acomodar una gran variedad de iones metálicos lo que permite variar las propiedades del macrociclo.²¹⁸⁻²¹⁹ El aumento en el número de sustituyentes en la periferia, causa superposición de orbitales conduciendo a la deformación en la planaridad del macrociclo. Las porfirinas son sistemas aromáticos, debido a que poseen 18 electrones π conjugados que cumplen con la regla de Hückel.⁸ Los macrociclos tetrapirrólicos son sistemas rígidos y en ausencia de sustituyentes muestran considerable estabilidad térmica.²¹⁶

Las porfirinas cuando son irradiadas con luz durante diferentes períodos de tiempos, pueden perder la intensidad en sus bandas de absorción y de emisión, proceso que se conoce como fotodegradación o fotoblanqueo en castellano, o como *photobleaching* en inglés.²²⁰ Existen dos tipos de procesos que dan lugar a un cambio químico irreversible en el cromóforo²²⁰:

- ✓ La fotomodificación, en la cual se produce una pérdida en la absorbancia o en la emisión de fluorescencia a ciertas longitudes de onda, pero el cromóforo se conserva en una forma modificada. Por ejemplo cuando la hematoporfirina se disuelve en un *buffer* acuoso, si se sigue su espectro de absorción en el tiempo, se observa que la intensidad de su banda principal disminuye y que al mismo tiempo aparece una nueva a 640 nm.
- ✓ El verdadero fotoblanqueo, en el cual se produce un cambio químico muy grande en la estructura del cromóforo al formarse fragmentos del mismo y, la intensidad de las bandas de absorción disminuye obteniéndose una solución incolora.²²¹ Este proceso se observó con distintas porfirinas disueltas en solución y administradas en ratas luego de ser iluminadas, y se evidenció fotoblanqueo de Photofrin[®], un fotosensibilizador disponible comercialmente para el tratamiento de melanomas, cuando se empleó para el tratamiento del cáncer en distintos pacientes enfermos.²²⁰ El fotoblanqueo de las porfirinas tiene como ventaja

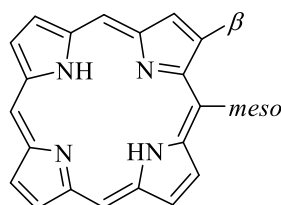
principal que es uno de los mecanismos que permiten quitar el fotosensibilizador del organismo luego de ser administrado y de ejercer su función. Sin embargo, es importante que la fotodegradación de la porfirina ocurra más allá del tiempo de irradiación necesario para eliminar los microorganismos mediante la PDI (sección 1.3.).



Esquema N°14. (A) Estructura molecular del macrociclo tetrapirrólico de porfirinas. (B) Imágenes en tres dimensiones (3D) del anillo central.

1.3.1.2. Síntesis de porfirinas

La síntesis de porfirinas es de suma importancia debido a que involucra un amplio espectro de aplicaciones científicas.²²² El control de la disposición de distintos sustituyentes en la periferia del macrociclo permite adaptarlo para aplicaciones específicas. Existen dos patrones diferentes de sustitución: la posición β y *meso* (Esquema N°15).



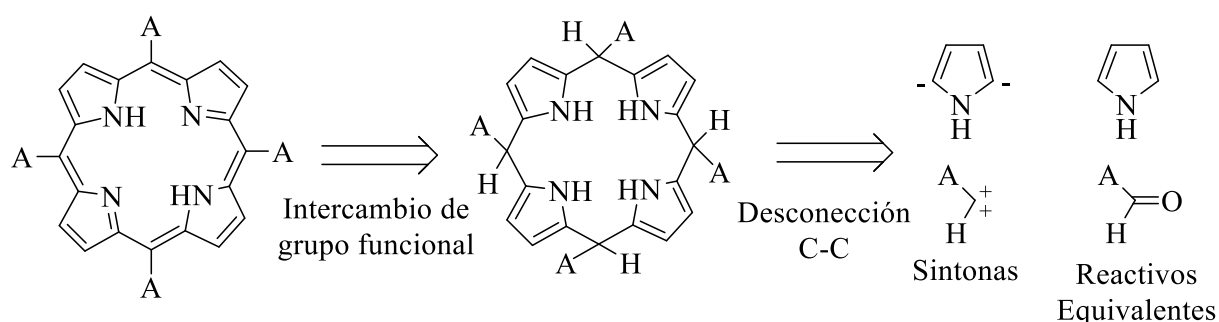
Esquema N°15. Posiciones *meso* y β sobre el macrociclo tetrapirrólico.

Las β -porfirinas se asemejan a otras porfirinas ya existentes en la naturaleza, mientras que las *meso*-porfirinas no presentan homólogos biológicos directos. Sin embargo, para estas últimas se han encontrado diversas aplicaciones como modelos biomiméticos y como componentes en materiales químicos.⁸ La popularidad que tiene la síntesis de porfirinas *meso*-sustituidas es debida a que son fáciles de obtener a partir de reactivos disponibles comercialmente ya que no se necesitan condiciones de reacción extremas.²²³

1.3.1.2.1. Síntesis de *meso*-porfirinas simétricas

Método de Rothermund

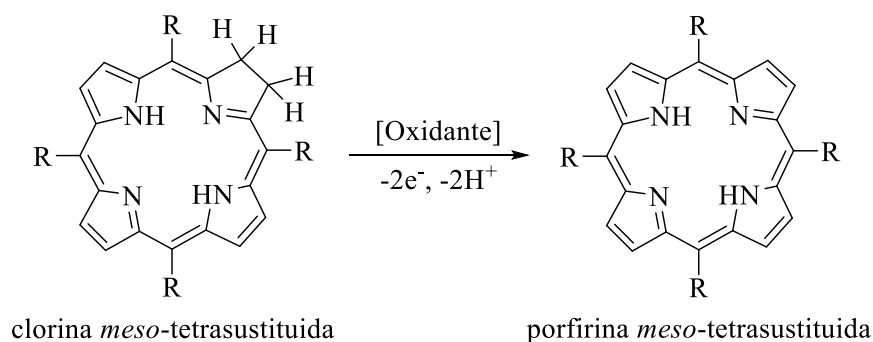
El análisis retrosintético de una porfirina simétrica A_4 , es decir con cuatro sustituyentes iguales A en posiciones *meso* (Esquema N°16), muestra que el material de partida para la síntesis de macrociclos tetrapirrólicos puede ser reducida a una mezcla binaria de aldehído y pirrol. Sin embargo, dependiendo de los grupos sustituyentes en el aldehído y de las condiciones de reacción, la formación del macrociclo compite con numerosas reacciones de polimerización lineal que limitan el rendimiento y dificultan los procesos de purificación.²²⁴



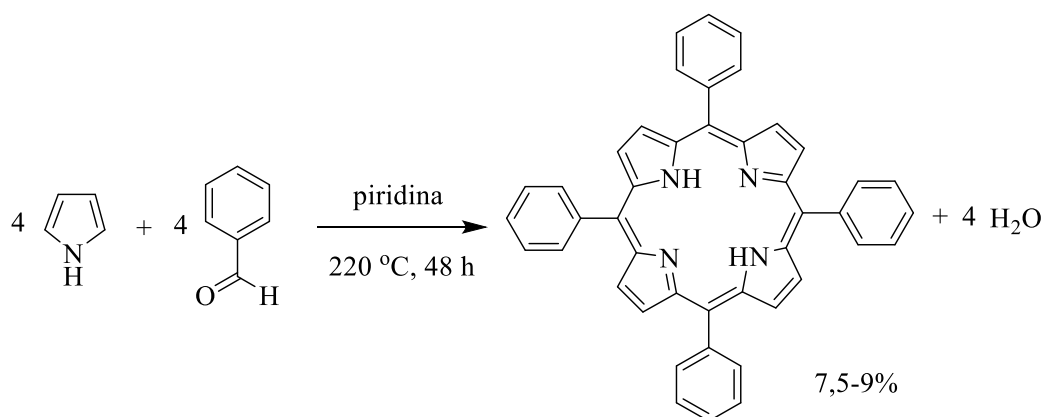
Esquema N°16. Análisis retrosintético de una porfirina simétrica A_4 .

Las primeras síntesis de porfirinas simétricas fueron llevadas a cabo por Paul Rothermund en 1935. Primero se investigó la síntesis de *meso*-tetrametilporfirina a partir de la reacción de acetaldehído y pirrol. Luego, mediante la reacción de formaldehído y pirrol en metanol, en presencia de piridina y atmósfera de nitrógeno a 90-95 °C durante 30 h de reacción, se obtuvo la porfirina correspondiente con un rendimiento de ~10 %.²²⁵⁻²²⁶ Usando una metodología similar, calentando a 140-150 °C durante 24 h fueron sintetizadas porfirinas sustituidas en posición *meso* por grupos metil, propil, isobutil, 3-metoxi-4-hidroxifenil, 2-hidroxifenil, 3-hidroxifenil y 4-metoxifenil. Sin embargo, el examen detallado de los productos de reacción mostró la presencia de un 10-20% de clorina *meso*-tetrasustituida (sección 1.3.), la cual debía ser separada por cromatografía u oxidada a la correspondiente porfirina (Esquema N°17).

En 1941 Rothermund describe en detalle la síntesis de 5,10,15,20-tetrakis(fenil)porfirina (TPP). La reacción se llevó a cabo a 220°C durante 48 h, luego de mezclar pirrol (10 ml, 3,6 M) y benzaldehído (20 ml, 4,9 M) en 20 ml de piridina para dar la porfirina TPP con un rendimiento de 7,5-9,0 % (Esquema N°18).²²⁷

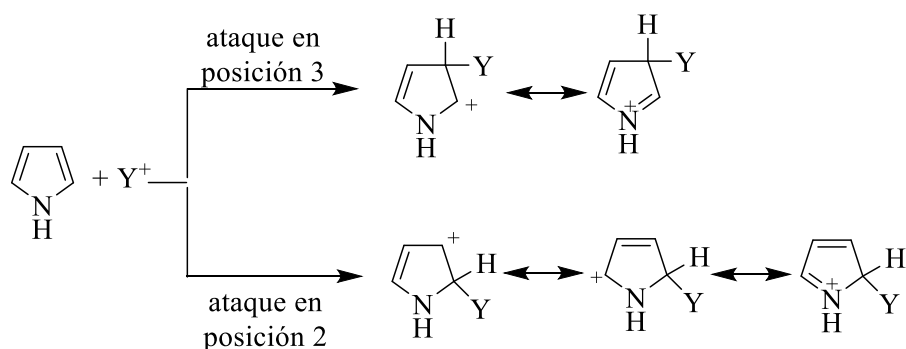


Esquema N°17. Oxidación de clorina a porfirina.



Esquema N°18. Síntesis de TPP utilizando el método de Rothmund.

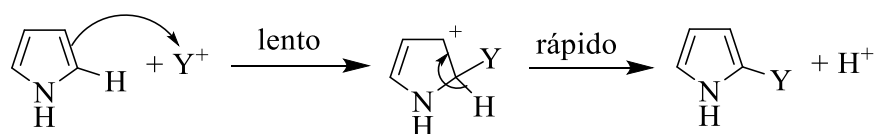
La formación de las porfirinas se genera debido a la densidad electrónica en el anillo de pirrol, la cual le confiere gran reactividad para la sustitución electrofílica aromática (S_EAr). Cuando se produce el ataque en posición 2 del pirrol, las tres estructuras resonantes generadas le confieren mayor estabilidad al ion (Esquema N°19).



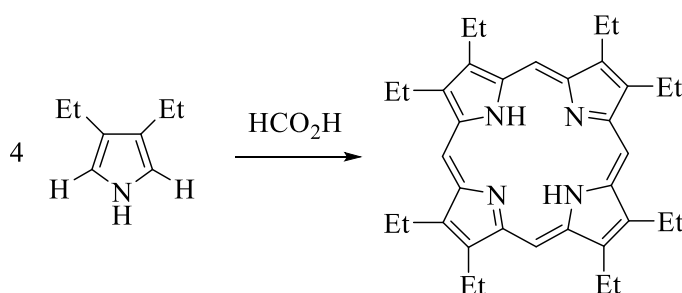
Esquema N°19. Estructuras resonantes del pirrol según el ataque electrofílico en distintas posiciones.

El paso que controla la reacción de S_EAr es la unión del reactivo electrófilo al anillo aromático, que sucede de modo tal que se genera el carbocatión intermediario más estable

(Esquema N°20). De esta manera se ve favorecida la síntesis del macrociclo y además, pueden ser sintetizadas octaalquilporfirinas simétricas fácilmente a partir de pirroles sustituidos en las posiciones 3 y 4 (Esquema N°21).



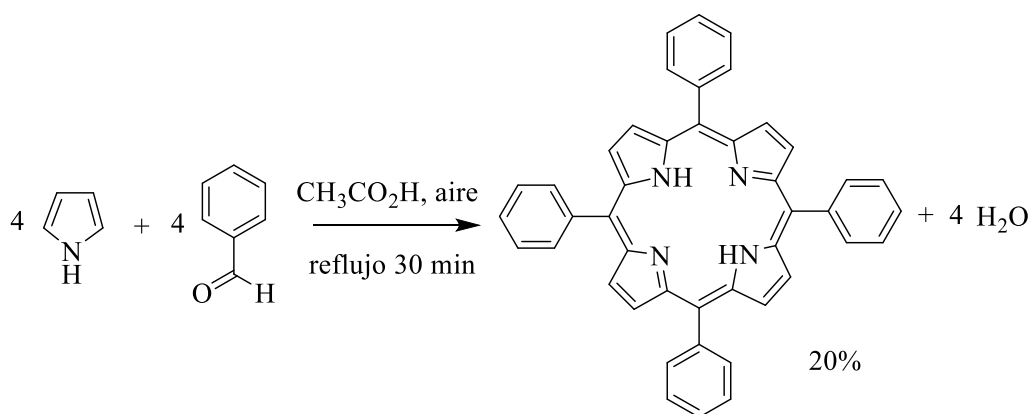
Esquema N°20. Sustitución electrofílica aromática al pirrol.



Esquema N°21. Síntesis de octaetilporfirina.

Método Adler

Posteriormente Alan D. Adler y col., usaron un método modificado llevando a cabo la reacción de benzaldehído y pirrol en una variedad de solventes ácidos a reflujo expuestos al aire.²²⁸ Los rendimientos aumentaron a ~20% cuando se trató la mezcla de reacción con ácido acético, benceno acidificado con ácido cloroacético o ácido trifluoroacético (TFA). El rendimiento más alto se obtuvo cuando se estudió la reacción en benceno con ácido cloroacético a reflujo durante 36 h en presencia de aire. Al igual que en el método utilizado por Rothermund, se obtenía un porcentaje entre 2-10% de clorina, la cual se trataba fácilmente con el oxidante 2,3-dicloro-5,6-dicianobenzoquinona (DDQ) a reflujo en tolueno.



Esquema N°22. Síntesis de porfirina TTP.

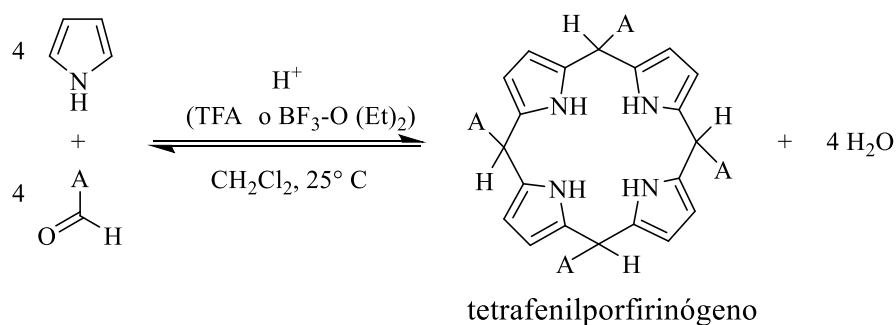
Al estudiar la síntesis de la porfirina TPP, las condiciones óptimas se obtuvieron cuando se trabajó con ácido propiónico a reflujo durante 30 min y expuesta al aire (Esquema N°20). Sin embargo, el problema principal en la purificación y el aislamiento de la porfirina continúa debido a la presencia de productos indeseables, tales como oligómeros de pirrol de cadena abierta.

Método Lindsey

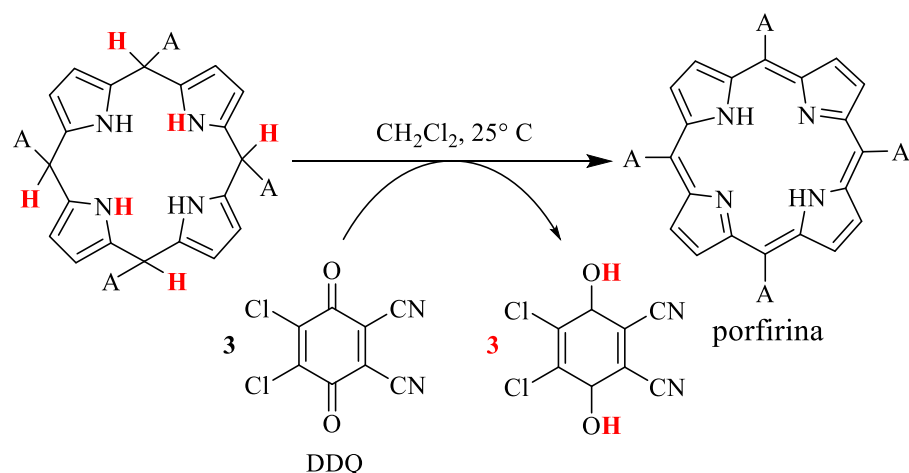
El desarrollo de estrategias de síntesis de porfirinas *meso*-sustituidas continuó en estudio, con el fin de mejorar las condiciones de reacción, tiempo de síntesis, rendimiento y generación de nuevos sistemas modelos de porfirinas. A finales de 1980 Jonathan S. Lindsey y col.,²²⁹ desarrollaron condiciones próximas a las de equilibrio para la obtención de porfirinas simétricas con un rendimiento entre 35-40%. En este método, pirrol y el benzaldehído deseado reaccionan reversiblemente a temperatura ambiente, usando diclorometano como solvente y catalizado con trazas de ácido TFA o trifluoruro de boro-éter etílico ($\text{BF}_3\text{-O}(\text{Et})_2$), para formar el ciclo tetrafenilporfirinógeno (forma reducida de la porfirina) en condiciones de equilibrio termodinámico. Esta primera reacción alcanza su máximo rendimiento en un período de entre 30 a 60 min y es sensible a la cantidad de ácido catalizador usada.²¹⁶ La condensación entre el pirrol y el aldehído es más compleja que la representada en el Esquema N°23. En realidad se conoce poco sobre los productos no deseados de la reacción, especialmente sobre la distribución de pirrometanos oligoméricos lineales.²¹⁶ Uno de los principales productos secundarios es la formación de dipirrometanos, los cuales son levemente estables.

Luego, en una segunda etapa se agrega un oxidante en cantidades estequiométricas tal como DDQ o *p*-cloranilo, para convertir irreversiblemente el porfirinógeno en la porfirina (Esquema N°23). La reacción con DDQ es rápida y transcurre a temperatura ambiente. Debido a sus propiedades DDQ es ampliamente usado como agente oxidante, en especial para los carbociclos fusionados. El proceso de oxidación generalmente involucra uno o más sitios bencílicos dando un producto aromático. Cada una de las posiciones *meso* de la porfirina (5, 10, 15 y 20, Esquema N°14) son sitios bencílicos del tetrafenilporfirinógeno, los cuales son oxidados para dar como producto final la porfirina.²¹⁶ Generalmente no se aíslan productos intermedios si se usan cantidades estequiométricas de DDQ. Como este agente oxidante intercambia 2e^- y 2H^+ , se requieren tres moléculas del oxidante por unidad del porfirinógeno o hexahidroporfirina (Esquema N°23).

A) Condensación



B) Oxidación

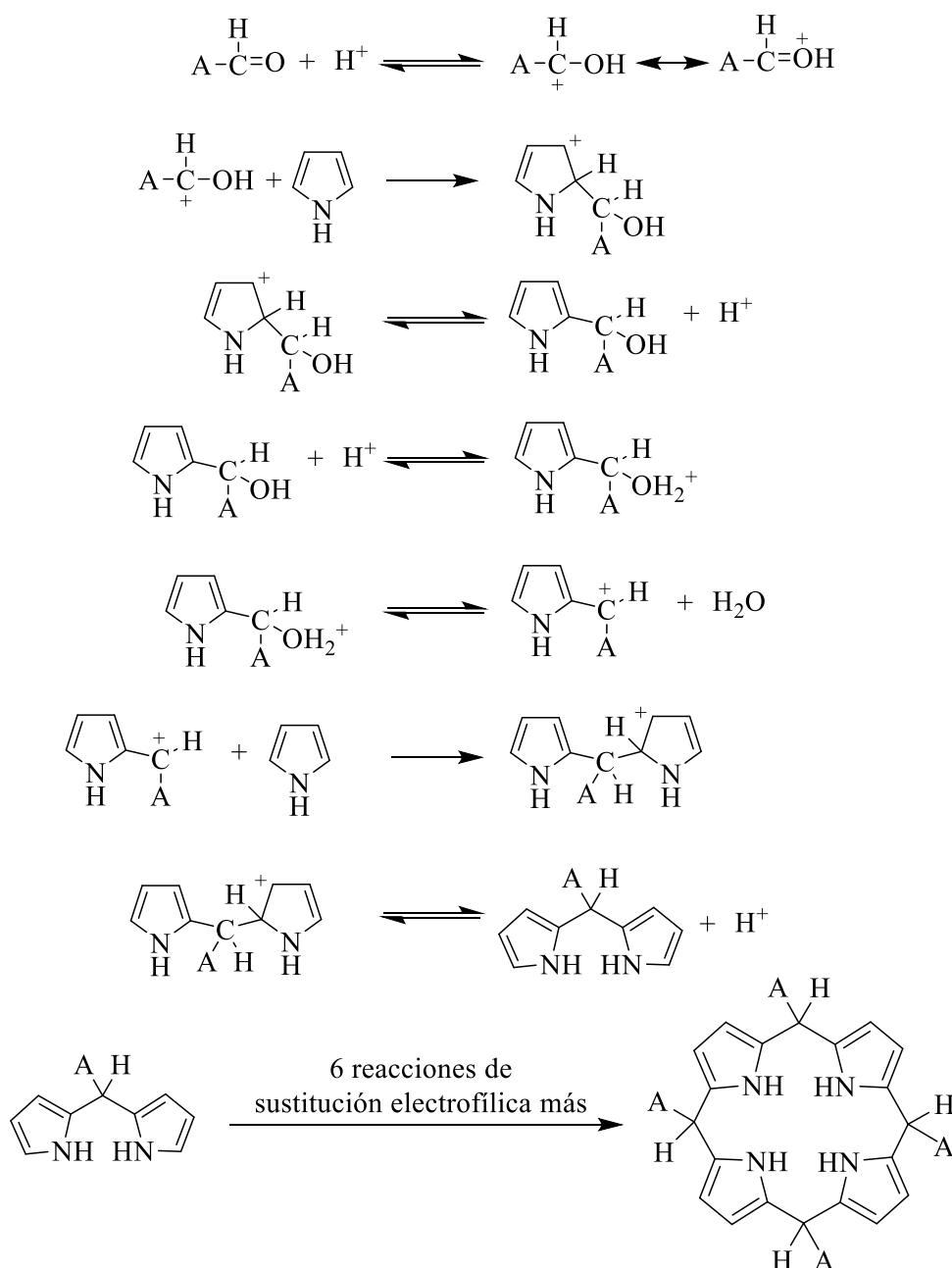


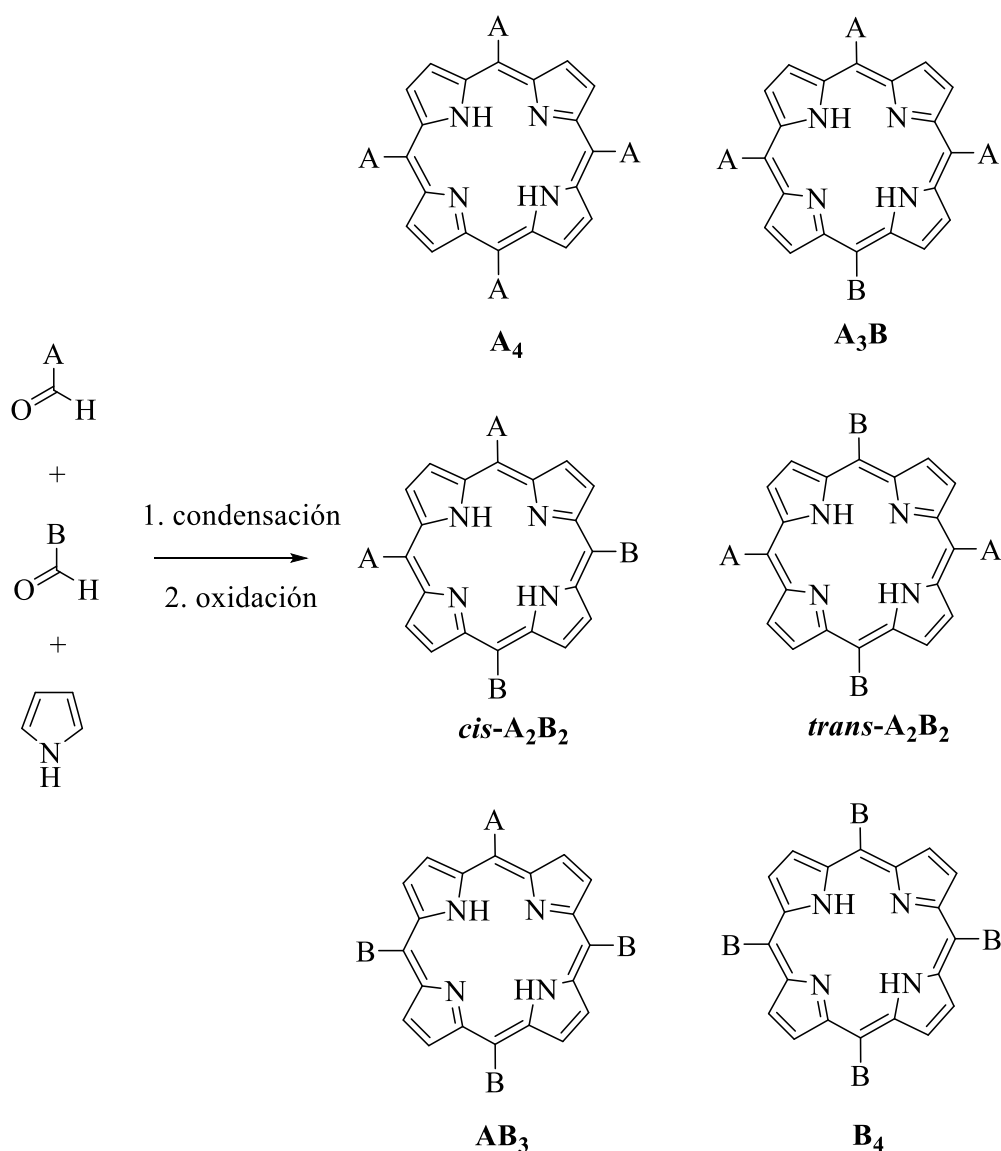
Esquema N°23. Reacción de dos pasos. (A) Condensación de pirrol y aldehído catalizada por ácido que da como producto un tetrafenilporfirinógeno. (B) Oxidación con DDQ a temperatura ambiente para obtener una porfirina como producto final.

La tetramerización del pirrol ocurre según el mecanismo descrito en el Esquema N°24. Inicialmente, el grupo carbonilo del aldehído proporciona un sitio para la adición nucleofílica. El protón se une al oxígeno carbonílico generando la deficiencia de electrones en el carbono carbonílico, de manera tal que favorece el ataque de un nucleófilo como el pirrol. El ensamble de los reactivos ocurre a través de ocho reacciones de sustitución electrofílica sucesivas, resultando en la formación de ocho nuevos enlaces carbono-carbono. El producto inicial no es una porfirina, sino más bien un porfirinógeno con grupos metileno saturados que separan los fragmentos de pirrol. La exposición al aire o a un agente oxidante del porfirinógeno genera la oxidación, dando como producto la porfirina con 18 electrones π conjugados.

1.3.1.2.2. Síntesis de *meso*-porfirinas asimétricas

Particularmente interesante es la síntesis de porfirinas sustituidas por una estructura molecular (A) que difiere de otro sustituyente (B).²³⁰ Las porfirinas asimétricas conteniendo dos tipos diferentes de sustituyentes en posición *meso* pueden ser preparadas por la condensación de una mezcla binaria de aldehídos, utilizando algunas de las técnicas descriptas anteriormente para porfirinas simétricas (Esquema N°25).²²⁹ Sin embargo, la mayor limitación encontrada en estos procesos de síntesis es la distribución de los sustituyentes alrededor del anillo tetrapirrólico, dando lugar a la obtención de una mezcla de hasta 6 porfirinas.



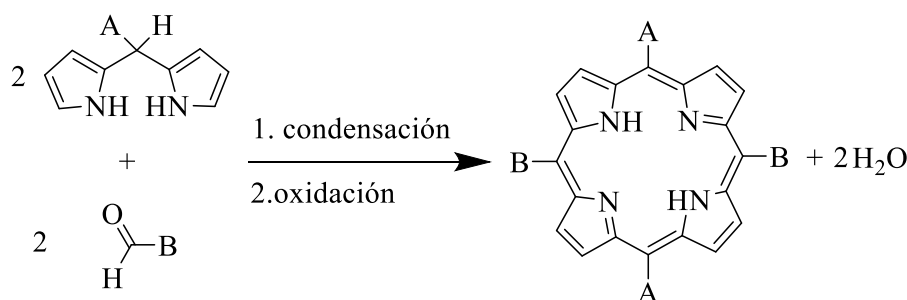
Esquema N°24. Mecanismo de tetramerización para la obtención del porfirinógeno.**Esquema N°25.** Síntesis de porfirinas a partir de una mezcla binaria de aldehídos y pirrol.

Suponiendo igual reactividad de los aldehídos, y una relación 1:1 de los mismos los rendimientos esperados serían: A₄ 6.25%, A₃B 25%, *cis*-A₂B₂ 25%, *trans*-A₂B₂ 12.5%, AB₃ 25% y B₄ 6.25%.²¹⁶ Las porfirinas de simetría AB₃ o A₃B son a menudo las más deseadas cuando se realiza la condensación con mezcla de aldehídos, y su rendimiento aumenta a un ~42% cuando la relación del aldehído conteniendo el sustituyente A respecto a B es 1:3 o A respecto a B es 3:1, respectivamente. Sin embargo, el porcentaje de rendimiento obtenido depende directamente de la reactividad de los aldehídos, así como del proceso de purificación.²³⁰⁻²³¹

1.3.1.2.3. Síntesis de *meso*-porfirinas asimétricas a partir de dipirrometanos

Porfirinas con simetría trans-A₂B₂

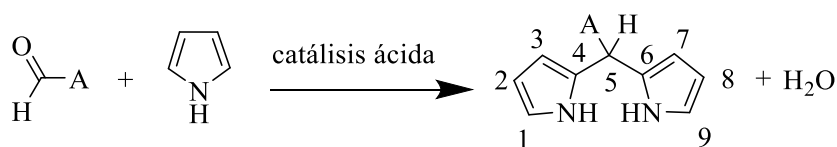
Un método más directo utilizado para la obtención de porfirinas con simetría *trans*-A₂B₂, involucra la reacción de un derivado de dipirrometano con un aldehído mediante una condensación de MacDonald [2+2] (Esquema N°26).²³² Esta reacción recibe su nombre debido a dos razones. Por un lado, a que la síntesis de porfirinas utilizando dipirroles es una condensación [2+2], es decir que dos dobles enlaces, cada uno perteneciente a una molécula diferente, reaccionan para dar un solo producto con pérdida de agua. La otra razón se debe, a que el grupo de investigación de S. Ferguson MacDonald en Ottawa, Canadá, fue el primero en demostrar que un dipirrometano sin sustituir en las posiciones 1 y 9 (Esquema N°25) reacciona con un 1,9-diformildipirrometano, en presencia de un catalizador ácido para dar como resultado una porfirina pura con buenos rendimientos.²³³



Esquema N°26. Síntesis de porfirinas *trans*-A₂B₂.

Este método requiere la síntesis previa de dipirrometanos sustituidos en la posición 5 (*meso*) (Esquema N°27). Los dipirrometanos pueden ser formados mediante la reacción de un aldehído con exceso de pirrol catalizado por ácido (TFA o BF₃-O(Et)₂) a temperatura ambiente.^{224, 230, 234} Este procedimiento permite obtener dipirrometanos con rendimientos de ~50-80 % con una amplia variedad de sustituyentes. La reacción de formación de dipirrometano también se puede realizar a temperaturas mayores en ausencia de ácido. Aunque los rendimientos obtenidos son bajos, este procedimiento permite la obtención de dipirrometanos con aldehídos heterocíclicos conteniendo átomos de nitrógeno.²³⁵

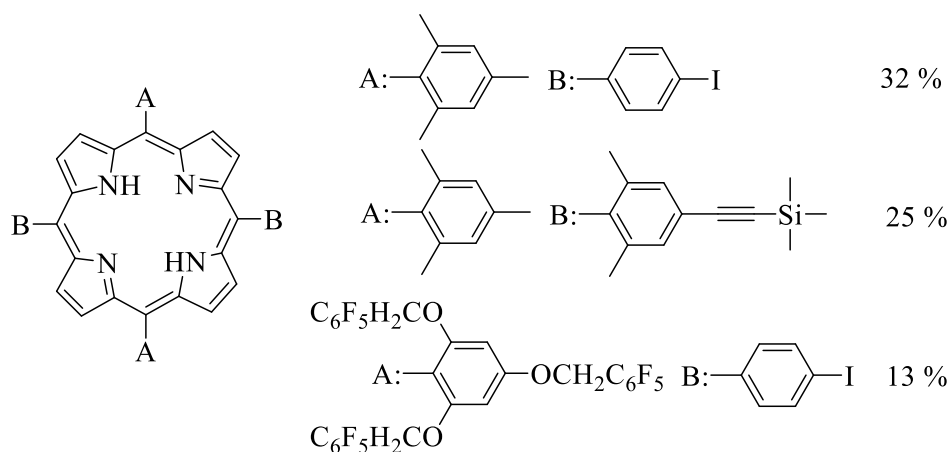
Por otro lado, cuando los aldehídos empleados en el proceso de síntesis están sustituidos por grupos básicos tales como aminas, el efecto catalizador del ácido se cancela y la reacción prácticamente no ocurre.²³⁶



Esquema N°27. Síntesis de dipirrometanos.

Un posible mecanismo de formación del dipirrometano es el mismo que se observa en la formación de la porfirina en el Esquema N°24, considerando que ocurren sólo dos sustituciones electrofílicas controladas por la relación estequiométrica de los reactivos.

Lindsey y col. utilizaron la condensación mostrada en el Esquema N°26 para obtener porfirinas *trans*-A₂B₂ con rendimientos de ~13-32 % dependiendo de los grupos sustituyentes en el aldehído (Esquema N°28).²³⁷⁻²³⁸



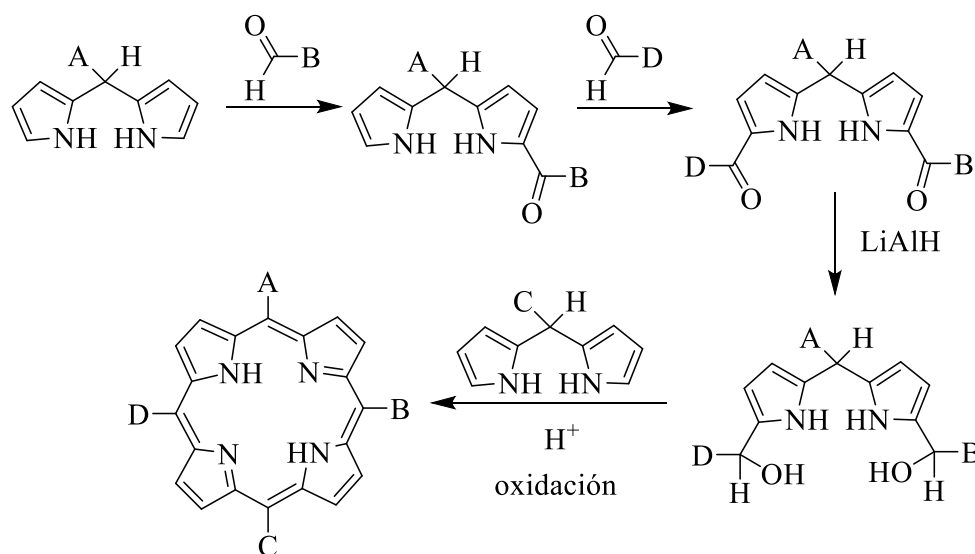
Esquema N°28. Síntesis de porfirinas *trans*-A₂B₂ a partir de dipirrometanos.

Porfirinas con simetría ABCD

En función de los métodos disponibles, limitaciones importantes se presentan cuando se requiere la síntesis de porfirinas con cuatro sustituyentes diferentes en posiciones *meso* (porfirinas ABCD). K. M. Smith y col. realizaron la síntesis, que implica la condensación catalizada por ácido propiónico de dos dipirrometanos diferentes a reflujo.²³⁹⁻²⁴⁰ Sin embargo, la escisión catalizada por ácido y subsiguiente recombinación resultó en la formación de porfirinas isoméricas no deseadas. Así, las porfirinas con simetría ABCD pueden ser obtenidas regioisoméricamente puras a partir de la síntesis de dos dipirrometanos, de los cuales uno debe ser funcionalizado en las posiciones 1 y 9. Luego, ambos dipirrometanos intervienen en la condensación de MacDonald del tipo 2+2 para formar el anillo tetrapirrólico.^{232, 239, 241} El rendimiento obtenido de las reacciones consecutivas no es

muy elevado, pero es el método utilizado para la síntesis de porfirinas ABCD puras (Esquema N°29).

Chang-Hee Lee y Jonathan S. Lindsey realizaron la síntesis de una porfirina-ABCD, la cual es controlada por la secuencia de los grupos introducidos en el dipirrometano.²⁴¹ Los sustituyentes adicionados fueron incorporados desde sales de benzoxatolium a un dipirrometano hasta tener tres grupos funcionales diferentes y finalmente, se adiciona un nuevo dipirrometano como se indica en el Esquema N°30.



Esquema N°29. Síntesis de porfirinas ABCD.

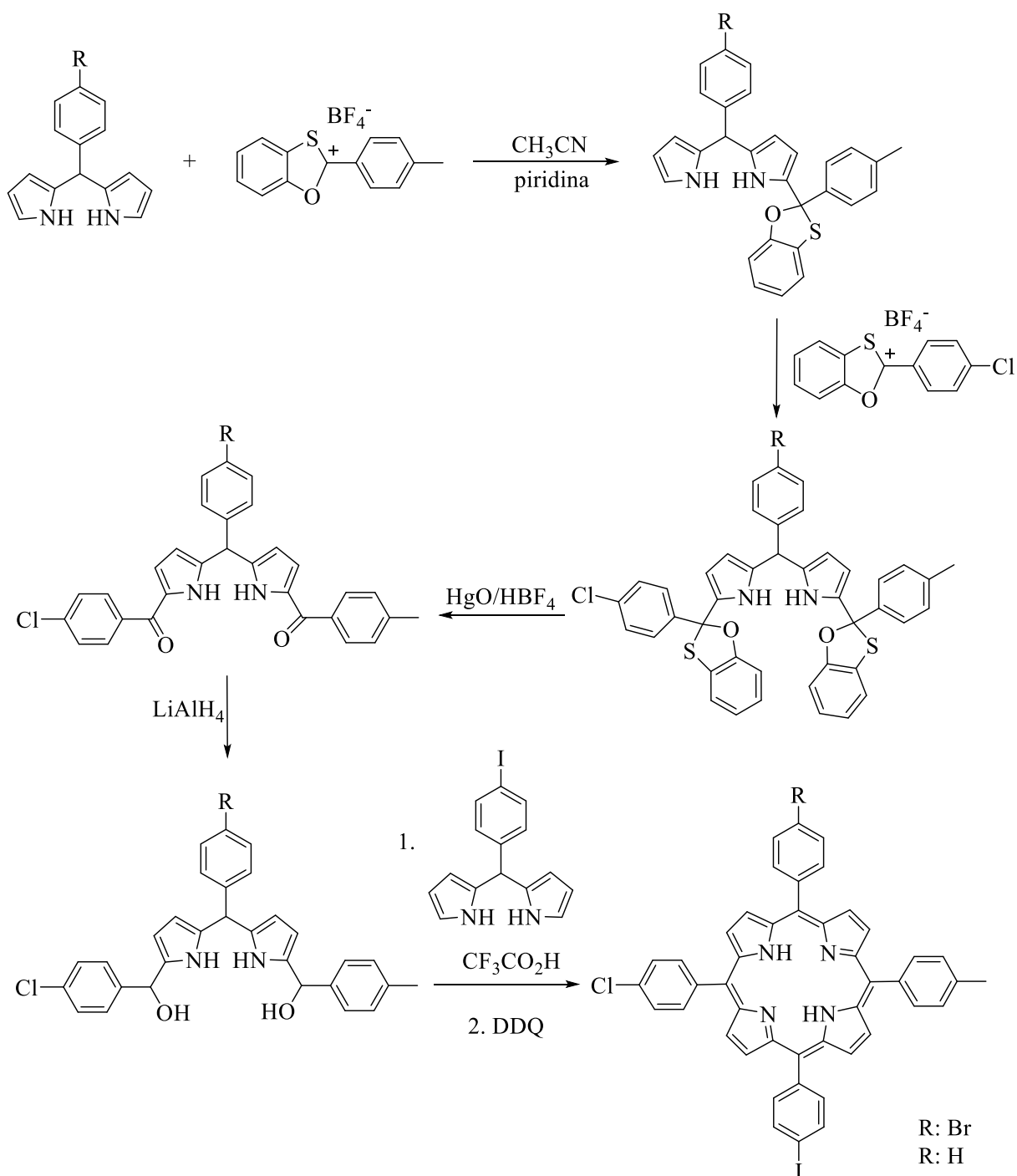
Porfirinas con simetría A_3B o AB_3

Resultan de suma importancia las porfirinas de simetría A_3B o AB_3 debido a que el sustituyente que se encuentra en menor proporción brinda la posibilidad de unir la porfirina con otras moléculas, y los tres grupos iguales permiten cambiar las propiedades físicas del macrociclo tetrapirrólico. La generación de un eje de polaridad intramolecular mejora la incorporación en células, lo cual resulta un requisito para un mejor efecto fotodinámico.

Las porfirinas A_3B se podrían obtener empleando la metodología desarrollada para la síntesis de porfirinas ABCD (Esquema N°29). Sin embargo, este procedimiento requiere al menos cinco etapas de reacción (Esquema N°31), con purificación de los productos intermedios y rendimiento final muy bajo.

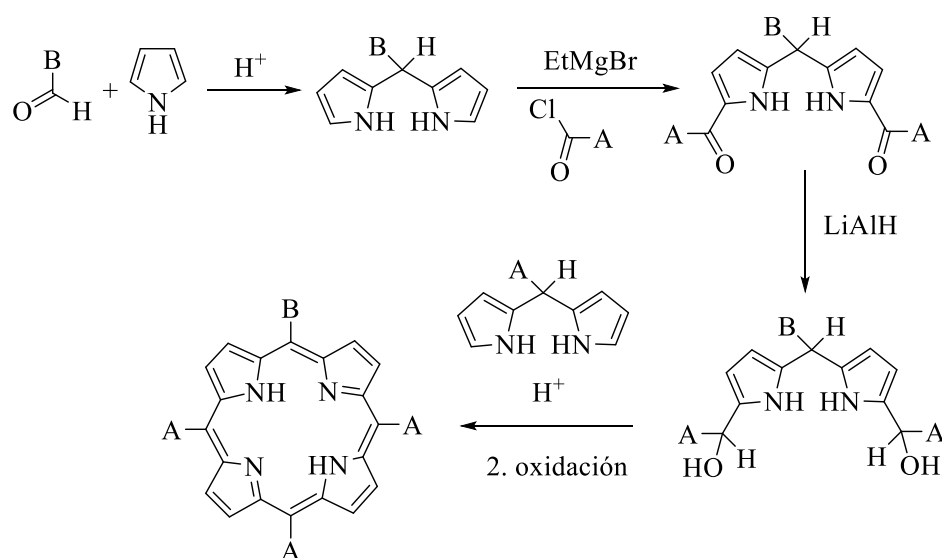
En los últimos años se desarrolló un procedimiento conveniente para la síntesis de porfirinas A_3B , el cual consiste en la condensación de dipirrometano con una mezcla binaria de aldehídos.²³⁰ Esta metodología permite obtener también la porfirina simétrica A_4 (cuatro

grupos iguales) y la porfirina *trans*-A₂B₂, las cuales pueden separarse por técnicas cromatográficas (Esquema N°32). En general, esta procedimiento presenta ventajas con respecto a la síntesis tradicional (mezcla binaria de aldehídos y pirrol), debido principalmente a un proceso de purificación más sencillo y a la obtención de la porfirina deseada con rendimientos ~5 veces superiores. En estas porfirinas, el grupo distinto a los demás sustituyentes permite la formación de moléculas díadas como por ejemplo, moléculas biológicamente activas.²⁴²

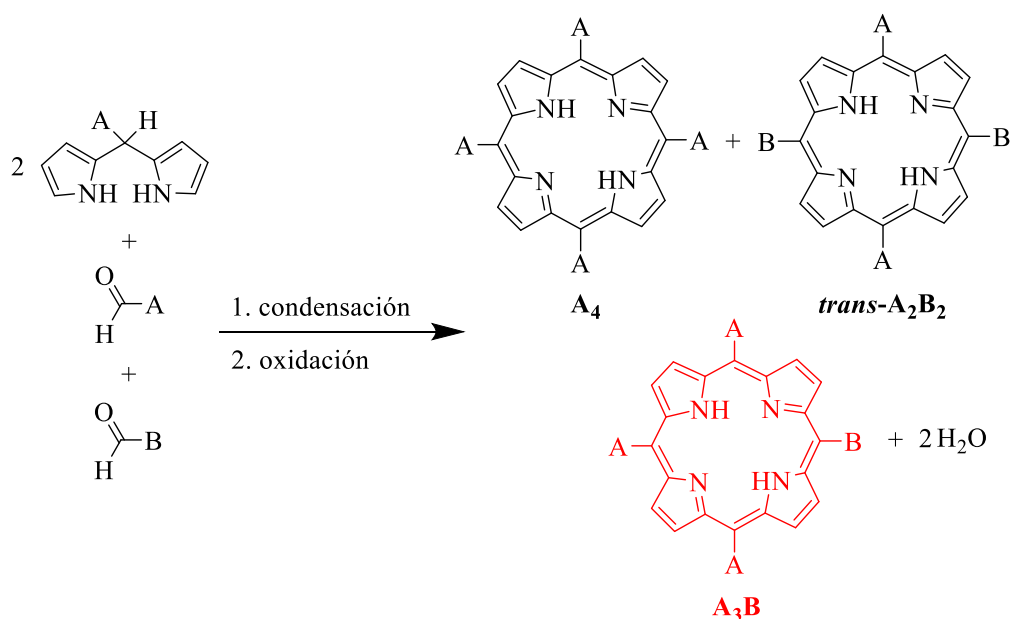


Esquema N°30. Pasos de síntesis porfirina ABCD.

El mecanismo de obtención de porfirinas a partir de aldehídos y dipirrometanos se detalla en los Esquema N°33 y Esquema N°34. Inicialmente, el aldehído se activa en presencia de ácido y luego el dipirrometano sufre el ataque del carbocatión en la posición 1. Por deshidratación catalizada por ácido se genera el intermediario I. La repetición de este proceso añade el siguiente dipirrometano. Por la pérdida de un protón se genera la especie II (Esquema N°33), la cual sufre un nuevo ataque electrofílico para cerrar el macrociclo, y así obtener el porfirinógeno que luego por oxidación da como producto la porfirina (Esquema N°34). Es importante destacar que estos pasos de reacción ocurren en un mismo recipiente.

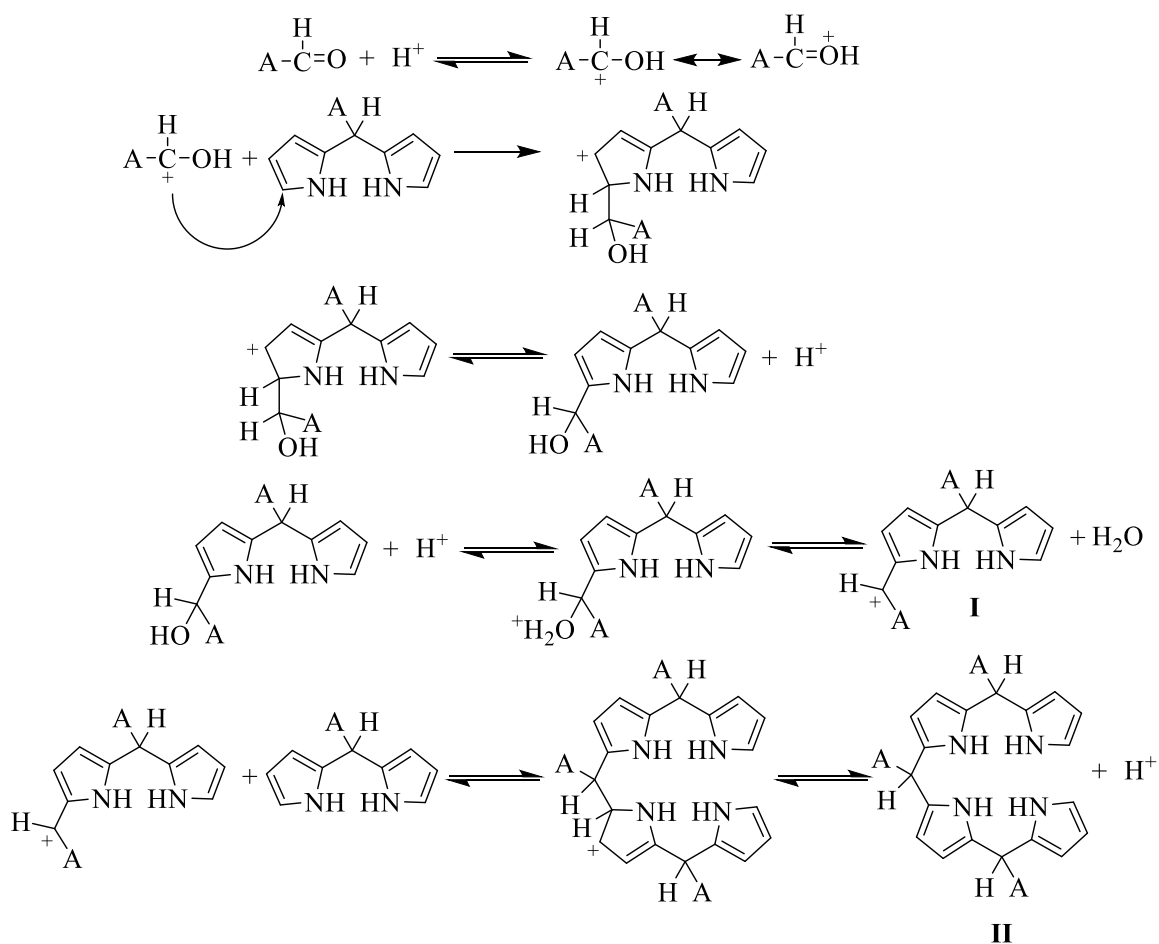


Esquema N°31. Síntesis de porfirina A_3B por etapas.



Esquema N°32. Síntesis de porfirina A_3B a partir de dipirrometanos.

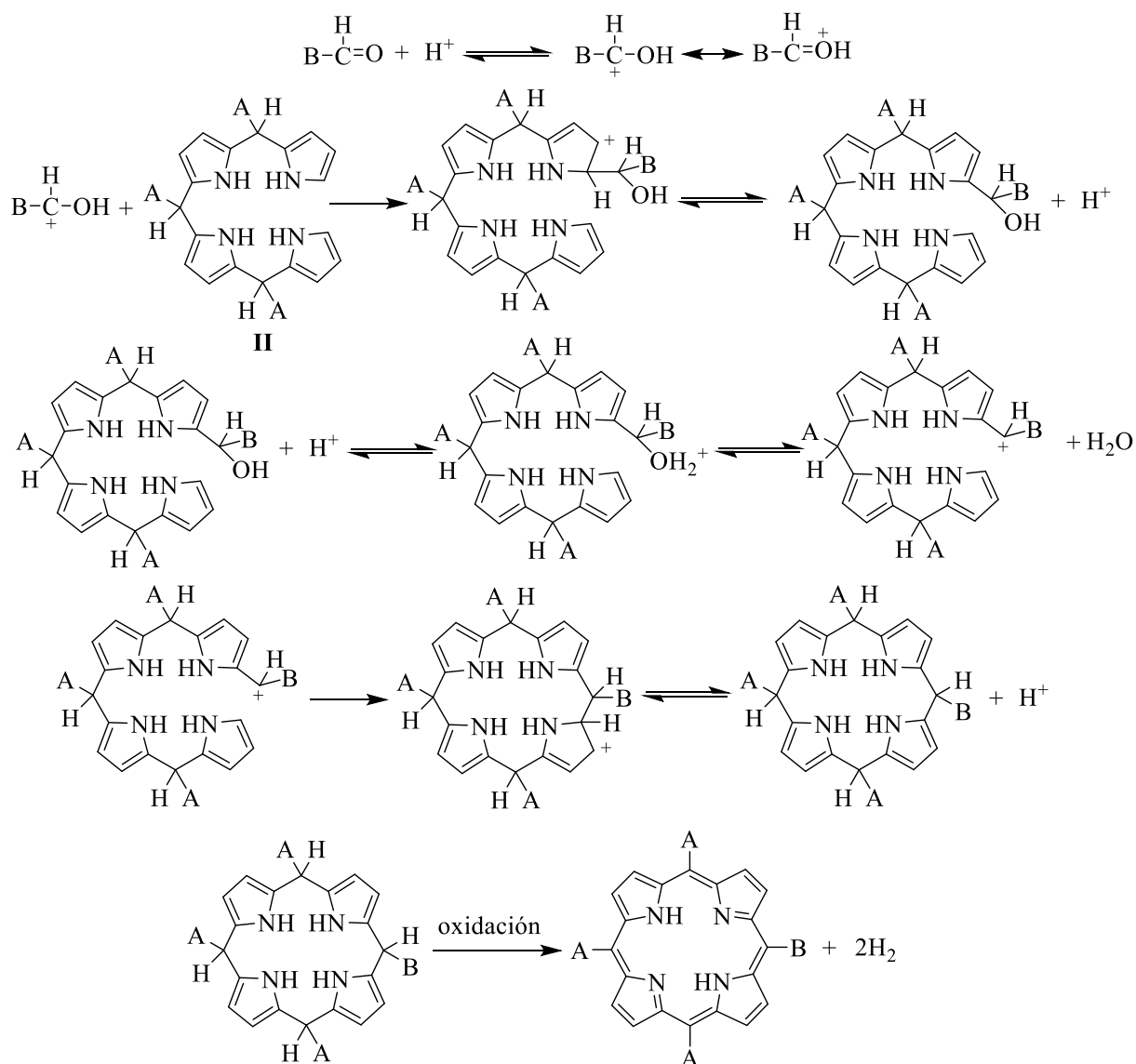
Si bien la importancia de las porfirinas asimétricas radica en la mejor incorporación del macrociclo tetrapirrólico en una célula microbiana, también resultan de suma importancia los fotosensibilizadores que contienen grupos catiónicos, los cuales son efectivos para la inactivación de bacterias Gram negativas y levaduras debido a que facilitan la interacción con la envoltura celular (sección 1.3.).²⁴³⁻²⁴⁴ En general se han utilizado como sustituyentes aminas, tales como anilina y piridina. Estos derivados aromáticos se comportan como bases muy débiles y las cargas positivas son formadas mediante la alquilación exhaustiva para producir aminas cuaternarias. Las aminas alifáticas presentan una basicidad mayor, por lo cual podrían protonarse en las condiciones de trabajo en el medio biológico generando cargas positivas intrínsecas.



Esquema N°33. Formación de tetrapirrol de cadena abierta.

La síntesis de porfirinas simétricas a partir de dipirrometanos, favorece los rendimientos de producción de las mismas. En general, la síntesis de los dipirrometanos y porfirinas se realiza a partir de la condensación de aldehídos catalizada por ácidos. Sin embargo, cuando se emplean aldehídos sustituidos por grupos aminos, se presenta la

dificultad de que estos neutralizan al catalizador frenando la reacción.^{235, 245} Una de las alternativas para solucionar este problema es la protección de los grupos amino, formando derivados de amida.²⁴⁶ Esta metodología agrega dos pasos más al proceso de síntesis. Otra alternativa, es la síntesis de dipirrometanos con sustituyentes básicos a altas temperaturas, sin utilizar catálisis ácida. Posteriormente, este intermediario, más reactivo que la mezcla directa de aldehído y pirrol, puede utilizarse para la síntesis de la porfirina con exceso del catalizador ácido.



Esquema N°34. Mecanismo de obtención de porfirina A_3B a partir del intermediario II y aldehído.

1.3.1.3. Características espectroscópicas

Las porfirinas presentan dos tipos de bandas características en el espectro de absorción. Una banda intensa alrededor de 420 nm, llamada banda *Soret* o B, con coeficientes de

absorción molar del orden de $\varepsilon \sim 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, y cuatro bandas de menor intensidad en la zona comprendida entre 500-700 nm llamadas bandas *Q*, cuyo ε es de aproximadamente $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. En la Figura N°5A se observan las bandas características de macrociclos tetrapirrólicos derivados de tetrafenilporfirinas con configuración tipo *etio*.²¹⁶ Estas últimas son denotadas por números romanos a partir del sitio de menor energía. Existe una correlación entre la estructura y la intensidad relativa de las bandas *Q* de las porfirinas base libre.¹⁰ En la Figura N°5A, se muestra un espectro *tipo etio*, en el cual se observa que el ε de cada una de las bandas *Q* varía de la siguiente manera: $\text{VI} > \text{III} > \text{II} > \text{I}$.¹⁰ Cuando las porfirinas forman complejos con metales divalentes, como Zn(II), Cd(II), Pd(II), Fe(II), Mn(II) o Cu(II), el número de bandas *Q* se reduce a dos y se denotan como α (banda de menor energía) y β (banda de mayor energía) (Figura N°5B).^{10, 247}

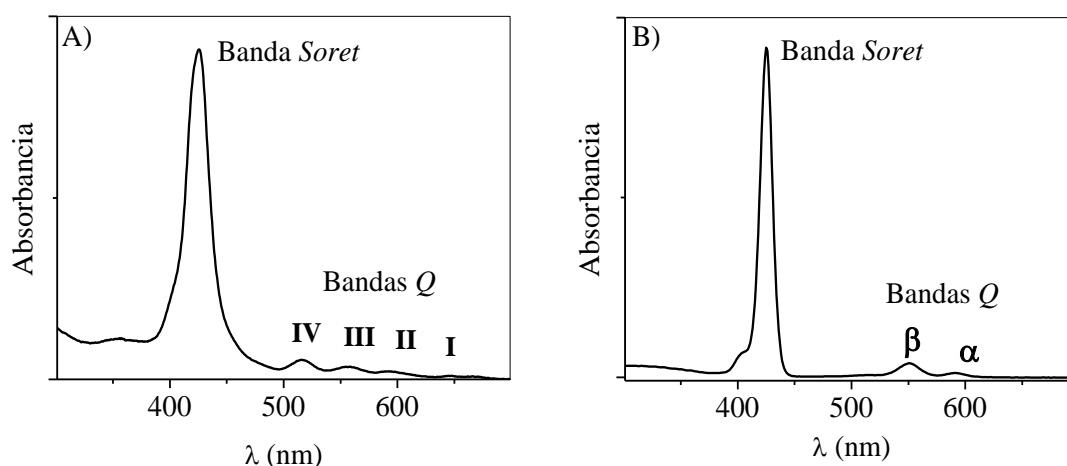


Figura N°5. (A) Espectro de absorción característico de tetrafenilporfirinas de base libre. (B) Espectro de absorción de porfirinas que forman complejos metálicos.

Los espectros de emisión de fluorescencia de las porfirinas presentan dos bandas a ~ 650 y 720 nm para porfirinas base libre, las cuales se asignaron a las transiciones $Q(0-0)$ y $Q(0-1)$ (Figura N°6A).^{8, 10} Tales transiciones corresponden a los decaimientos desde el primer estado excitado a los dos primeros niveles vibracionales del estado fundamental (0 y 1, respectivamente). Debido a la estructura rígida que caracteriza a los macrociclos tetrapirrólicos, los espectros de emisión presentan pequeños corrimientos de Stokes.²⁴⁸⁻²⁴⁹

La espectroscopia de excitación es una técnica de elevada sensibilidad que permite diferenciar y analizar las bandas *Q* presentes en las porfirinas, principalmente cuando es utilizada en concentraciones muy bajas o cuando se encuentra formando agregados. Además, en aquellos casos en los cuales el fotosensibilizador está disuelto en un microentorno biológico, donde el espectro de absorción podría superponerse con el de otros cromóforos

(como hemoglobina en la sangre), el espectro de excitación (Figura N°6B) puede ser utilizado para identificar la forma y la posición exacta de las bandas de absorción.²⁵⁰

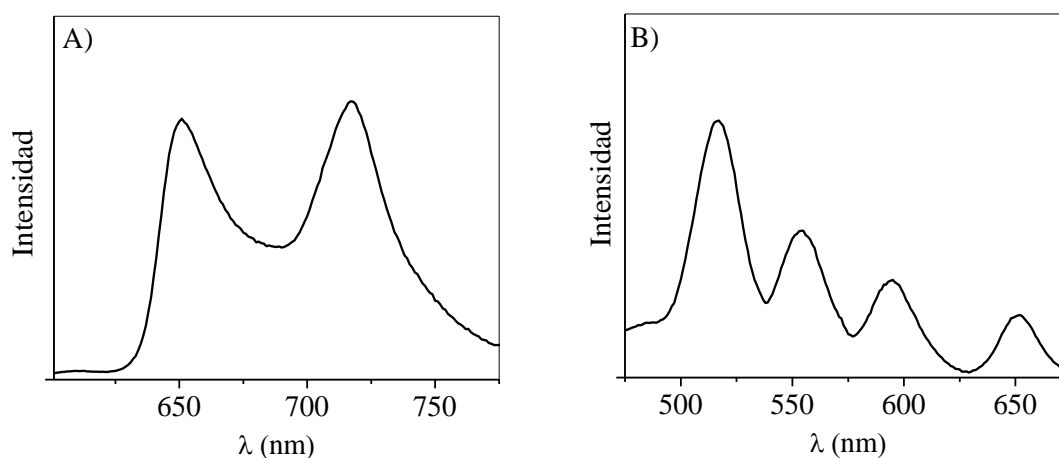
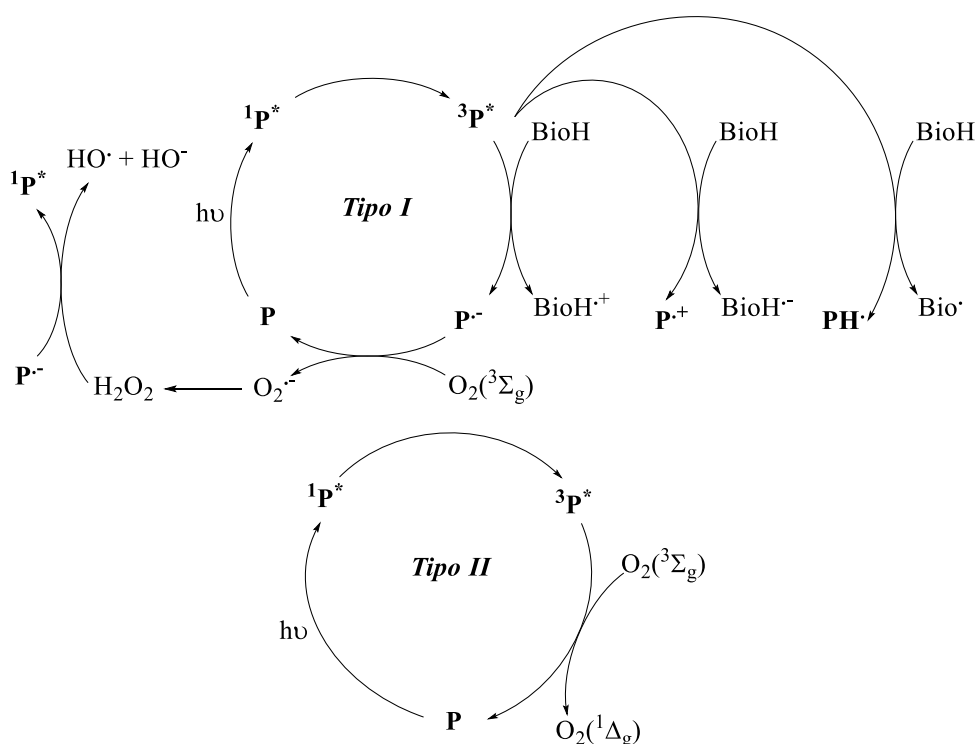


Figura N°6. (A) Espectro de emisión de fluorescencia característico de porfirinas. (B) Espectro de excitación de una porfirina base libre que muestra las bandas *Q* características de estos compuestos.

1.3.1.4. Propiedades fotofísicas

Las porfirinas son excitadas por la absorción de un cuanto de luz desde el estado fundamental del fotosensibilizador, al primer estado excitado singlete u otro estado singlete de mayor energía ($^1P_n^*$). Desde el estado $^1P_n^*$ las porfirinas disipan energía muy rápidamente (\sim ps) hasta alcanzar el $^1P^*$, el cual tiene un tiempo de vida de 1 a 5 ns. En general, para porfirinas base libre derivadas de tetrafenilporfirina, los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) tienen valores de $\sim 0,1$.²¹⁶ Alternativamente, puede producirse un entrecruzamiento de sistemas al primer estado excitado triplete $^3P^*$. El rendimiento cuántico de formación de triplete (Φ_T) es del orden de 0,6-0,8. En el proceso fotodinámico tipo I, el $^3P^*$ reacciona con un sustrato de origen biológico (BioH) para producir iones radicales o radicales libres a través de reacciones de transferencia de electrones o de protones (Esquema N°35). La transferencia de electrones entre el fotosensibilizador y el sustrato, está controlada por los potenciales de oxidación y de reducción relativos de las dos especies. La mayoría de estos radicales reaccionan instantáneamente con oxígeno molecular en su estado fundamental generando radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\cdot OH$) (Esquema N°35). Por otro lado, en el mecanismo fotodinámico tipo II, la porfirina desde el estado $^3FS^*$, transfiere la energía al oxígeno molecular en estado fundamental (Esquema N°35). En este fenómeno de crucial importancia en fotoquímica, el estado $^3P^*$ decae al fundamental 0P con la transferencia simultánea de su energía de excitación a la molécula de oxígeno, produciendo $O_2(^1\Delta_g)$ (Esquema N°35). Para que la

fotosensibilización sea eficiente, la energía del estado $^3P^*$ tiene que ser superior al estado excitado del $O_2(^3\Sigma_g)$. El intercambio de energía intermolecular desde una especie a otra conduce a la población de estados excitados, los cuales muchas veces son inaccesibles mediante absorción directa.⁹⁰ Generalmente los Φ_Δ de las porfirinas son de $\sim 0,5$.^{185, 243, 251} Sin embargo, existen algunas excepciones como por ejemplo TPPS⁴⁻ que generan grandes cantidades de $O_2(^1\Delta_g)$ con un $\Phi_\Delta=0,72$.²⁵² Otro modo que tiene la porfirina en un estado excitado para disipar su energía, es mediante reacción química con moléculas en estado fundamental conduciendo a la formación de productos. La mayoría de las reacciones químicas tienen lugar desde el estado $^3P^*$ debido a que el tiempo de vida de este estado de las porfirinas es mayor respecto al estado $^1P^*$.⁹⁰



Esquema N°35. Representación esquemática del mecanismo fotoquímico tipo I (transferencia de electrones y radical hidrógeno) y tipo II (transferencia de energía) de porfirinas.

Las porfirinas y sus derivados reducidos o modificados, son indiscutiblemente los ligandos por excelencia de la biología. Los ejemplos más comunes son los hemos (que se encuentran en hemoglobinas, mioglobinas, citocromos, catalasas y peroxidasas), clorofilas y bacterioclorofilas.²³³ El hierro es el metal quelante que se encuentra en hemos y el magnesio está presente en numerosas clorofilas y bacterioclorofilas. Existen otros productos naturales, derivados de macrociclos tetrapirrólicos, que poseen otros iones metálicos como por ejemplo la vitamina B12 que tiene cobalto y el factor 430 que posee níquel.²³³ Los

mecanismos utilizados en el accionar de metabolitos que corresponden a tetrapirroles, implican a menudo cambios en el estado de oxidación del metal central. Los macrociclos derivados de tetrapirrol son capaces de acomodar metales con distintos números de oxidación y por lo tanto, de diferente tamaño. Esto se debe a la flexibilidad y adaptabilidad del sistema quelante básico.²³³ La coordinación de porfirinas con metales produce cambios en su propiedades fotoquímicas. Así, en función del metal ubicado en el espacio central del macrociclo tetrapirrónico, va a ser la capacidad del fotosensibilizador de generar $O_2(^1\Delta_g)$. Generalmente, el metal zinc produce un aumento en el rendimiento del estado excitado triplete del fotosensibilizador por un efecto de átomo pesado, lo que da como resultado un incremento en el Φ_Δ . Así, la molécula tetrametoxifenilporfirina de base libre (TMP), tiene un $\Phi_\Delta=0,65$ en tetrahidrofurano y cuando la misma es coordinada con el metal zinc su rendimiento aumenta a $\Phi_\Delta=0,73$.²⁴³ El mismo efecto se observó con el metal cadmio ($\Phi_\Delta=0,73$). Sin embargo cuando TMP contiene cobre, la molécula no produce $O_2(^1\Delta_g)$.²⁴³ Resultados similares se encontraron con distintas porfirinas coordinadas con diferentes metales.^{185, 195, 247} Como se mencionó en la sección 1.3., la producción de $O_2(^1\Delta_g)$ se va a ver disminuida si el fotosensibilizador se encuentra agregado en el medio.

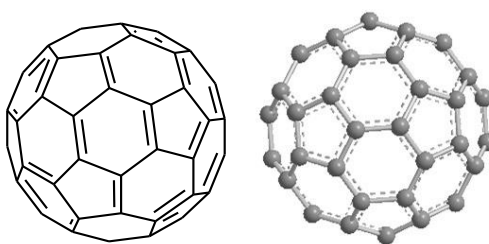
1.3.2. Fullerenos C_{60}

1.3.2.1. Propiedades generales

Desde su descubrimiento²⁵³ y aislamiento²⁵⁴ los fullerenos (originalmente llamados *buckminsterfullerenos*) han atraído la atención de un gran número de científicos. La forma más abundante de estos compuestos es el C_{60} . Esta molécula está constituida por 60 átomos de carbono dispuestos en una estructura esférica, de forma similar a una pelota de fútbol (Esquema N°36). Se trata de una organización estructural conocida como icosaedro truncado, que contiene 12 pentágonos y 20 hexágonos, en los cuales, cada átomo de carbono se encuentra unido a otros tres átomos adyacentes por medio de hibridización sp^2 .²⁵⁵ Los fullerenos habitualmente tienen un tamaño cercano a 1 nm, sin embargo tienden a asociarse espontáneamente en agregados de varias moléculas que alcanzan tamaños desde 10 nm hasta varias micras.²⁵⁶

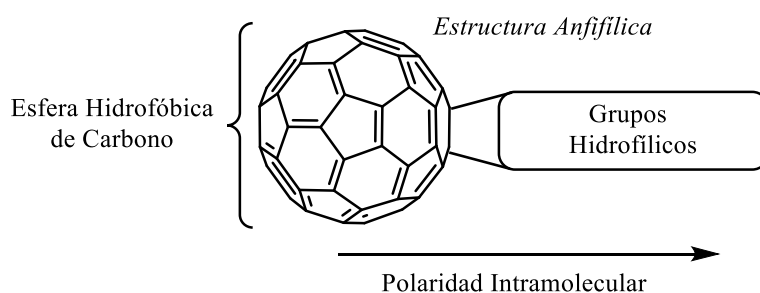
Los anillos aromáticos condensados presentes en el compuesto generan una conjugación extendida de orbitales moleculares que dan lugar a la absorción de la luz visible. También, su gran afinidad electrónica, que le permite aceptar hasta seis electrones, hace del fullereno un buen candidato como aceptor de éstos.²⁵⁷

Debido al creciente interés en la aplicación médica de los fullerenos en nanotecnología,²⁵⁸ estas moléculas han ganado considerable atención como posibles fotosensibilizadores para la inactivación fotodinámica de diversas enfermedades.¹⁸⁰ Los fullerenos presentan algunas ventajas interesantes con respecto a los fotosensibilizadores más convencionales. Son comparativamente más fotoestables y muestran menor fotoblanqueo en comparación con los compuestos derivados de tetrapirroles y colorantes sintéticos.⁸⁵ Esto se debe a que la estructura de carbono de los fullerenos es menos reactiva al $O_2(^1\Delta_g)$ que la estructura del tetrapirrol.⁶⁵



Esquema N°36. Estructura del fullereno C_{60} .

Desafortunadamente, el fullereno C_{60} presenta varios inconvenientes significativos para ser empleados en PDI. Poseen un alto grado de hidrofobicidad y una pronunciada tendencia a agregarse en soluciones acuosas y en medios biológicos, perjudicando la generación de una fotoactividad eficiente.²⁵⁹⁻²⁶⁰ Sin embargo, el desarrollo de la química covalente del C_{60} ha abierto la posibilidad de derivatizar la estructura esférica con distintos grupos funcionales, permitiendo mejorar su solubilidad en agua y disolventes biológicos, y así incrementar notablemente su utilidad biológica.^{85, 170, 261-263} Esta metodología basada en la modificación química de la esfera del C_{60} , conduce a la formación de una amplia variedad de derivados, que poseen diferentes propiedades físicas y químicas. Diversas cadenas laterales hidrófilas, anfifílicas, o estructuras de anillos condensados se han unido al núcleo esférico del C_{60} . Los derivados de fullereno recientemente reportados, se diseñaron para que presenten naturaleza anfifílica de acuerdo con la estructura general que se muestra en el Esquema N°37. La combinación de sustituyentes hidrófobos e hidrófilos en la estructura del sensibilizador resulta en la formación de un eje de polaridad intramolecular. Este efecto puede facilitar la penetración de la membrana celular y producir una mejor acumulación del fotosensibilizador en compartimentos subcelulares, mejorando la eficacia de la fotosensibilización.²⁴³



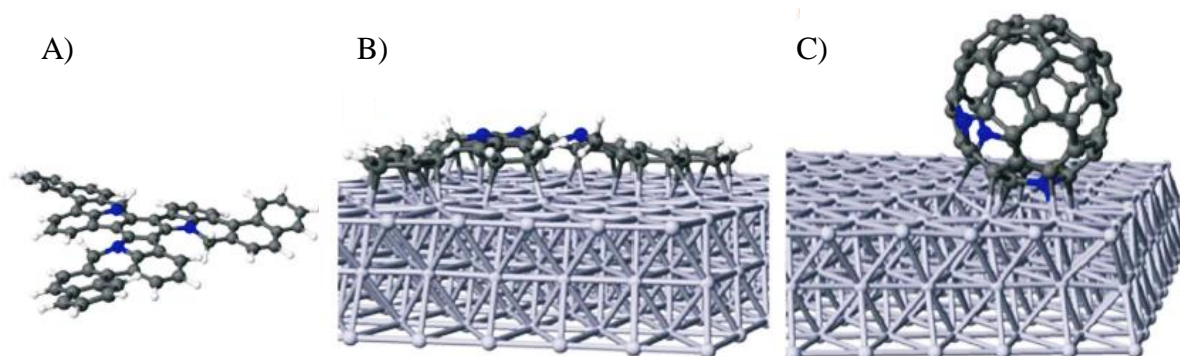
Esquema N°37. Estructura anfifílica de fullerenos.

Es posible lograr fullerenos solubles en agua a través de la unión de grupos amonio cuaternario en su estructura esférica.⁸⁵ La carga positiva creciente permite que interaccionen con las células y superen las barreras de permeabilidad microbianas. Sin embargo, su absorbancia disminuye con el aumento de la sustitución catiónica. A pesar de ello, la reducción de la hidrofobicidad, entre otras propiedades, tiende a aumentar la eficiencia de la PDI frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.^{51, 161, 171, 197} Cabe destacar que compuestos muy solubles en medios acuosos dejan de ser eficientes dado que se solubilizan en el medio, disminuyendo su interacción con los microorganismos que se desean erradicar.⁶⁵

1.3.2.2. Obtención de fullereno C₆₀

En 1990, W. Krätschmer y D. R. Huffman desarrollaron un método simple y eficiente para producir fullerenos en cantidades de gramos e incluso kilogramos, lo cual impulsó la investigación de los fullerenos.^{254, 264} En esta técnica, hollín de carbón es producido a partir de dos electrodos de grafito de alta pureza mediante la ignición de una descarga de arco entre ellos en una atmósfera inerte de gas helio. De manera alternativa, el hollín es producido por la ablación láser del grafito o la pirólisis de hidrocarburos aromáticos. Los fullerenos son extraídos del hollín usando un procedimiento de múltiples etapas. Primero, el hollín es disuelto en un disolvente orgánico apropiado, generalmente benceno. Este paso lleva a una disolución que contiene más del 75% de C₆₀, así como otros fullerenos. Luego, estas fracciones son separadas usando cromatografía empleando hexano como fase móvil y alumina como fase estacionaria. El fullereno C₆₀ es separado del C₇₀ dando lugar a una fracción color magenta y otra roja, respectivamente.^{254, 264} Sin embargo, la purificación del fullereno era un desafío para los químicos hasta hace poco cuando un equipo de investigadores españoles desarrolló una nueva metodología de obtención.²⁶⁵ Esta consiste en emplear un proceso de ciclodeshidrogenación de alta calidad catalizado por una superficie.

Después de depositar el compuesto aromático de partida sobre una superficie de platino y al calentar a 750 K, los precursores se transforman en la correspondiente molécula de fullereno C_{60} con un rendimiento de aproximadamente el 100%. Este procedimiento de obtención presenta ciertas ventajas. Por un lado, es posible sintetizar especies inusuales del fullereno como por ejemplo, triazafullerenos con tres cargas positivas ($C_{57}N_3$) (Esquema N°38).²⁶⁶ Además, si el proceso se lleva a cabo en una atmósfera que contiene otras especies, éstas se pueden encapsular para formar fullerenos endohédricos.



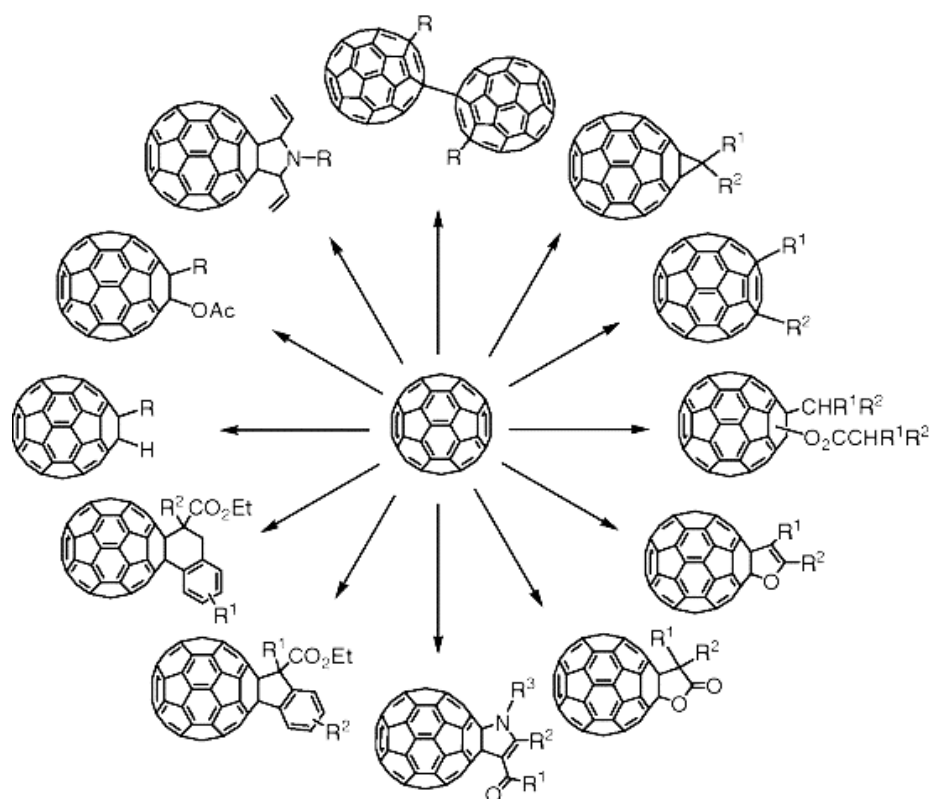
Esquema N°38. Síntesis de fullerenos a partir de precursores aromáticos mediante una ciclodeshidrogenación catalizada en la superficie de platino. (A) Estructura de la molécula aromática precursora. (B) Molécula adsorbida a temperatura ambiente (300 K) en la superficie del platino. (C) Estructura optimizada del fullereno formado después del proceso de ciclodeshidrogenación a 750 K. Adaptado de referencia 266.

1.3.2.3. Síntesis de derivados del fullereno C_{60}

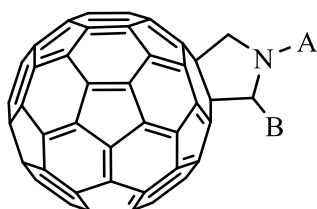
En la actualidad, el principal objetivo de la química del fullereno es la síntesis de derivados estables del mismo, que se puedan caracterizar y de estructura bien definida. En el Esquema N°39 se muestran algunas reacciones generales que han conducido a la obtención de distintos derivados del fullereno C_{60} .⁶⁵

Debido a la pobre deslocalización electrónica de su estructura, el C_{60} es una molécula con una elevada reactividad, comportándose como una poliolefina o como un alqueno deficiente de electrones, experimentando una gran variedad de reacciones químicas.²⁶⁷ Dentro de éstas, las más importantes y utilizadas son las reacciones de cicloadición, en donde el C_{60} reacciona con diversos nucleófilos.^{197, 268}

Una de las cicloadiciones más utilizadas para generar derivados del fullereno, es la reacción de cicloadición [3+2] desarrollada por Prato y col.,²⁵⁷ llevada a cabo a partir de iluros de azometina y C_{60} . Esta vía conduce a la obtención de fulleropirrolidinas, derivados en los que un anillo de pirrolidina se encuentra fusionado a un enlace [6,6] del fullereno (Esquema N°40).



Esquema N°39. Vías de síntesis y derivatización del fullereno C_{60} .²⁵⁶

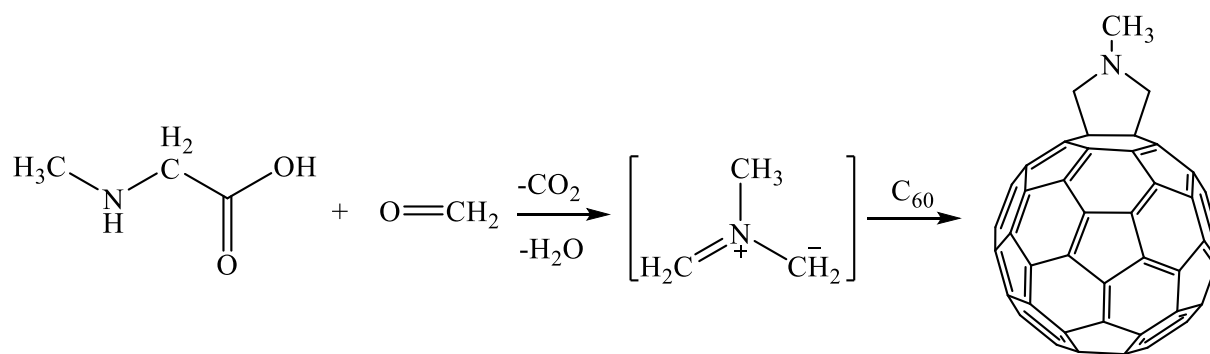


Esquema N°40. Representación estructural de derivados de fulleropirrolidinas.

La gran variedad de iluros de azometino sustituidos que pueden generarse a partir de productos de partida fácilmente accesibles, junto con la elevada reactividad de estas especies con olefinas pobres en electrones como el C_{60} , permite la obtención de fulleropirrolidinas altamente funcionalizadas con relativa facilidad.²⁶⁹

Uno de los procedimientos más versátiles y ampliamente utilizados para generar iluros de azometino es el denominado "método de descarboxilación", que consiste en la generación *in situ* del 1,3-dipolo intermediario (dipolo eléctrico por deslocalización de electrones), mediante descarboxilación de las sales de iminio, resultantes de la condensación de aldehídos con aminoácidos. Esta síntesis consiste en una reacción pericíclica en la que dos enlaces π se pierden y se forman dos enlaces σ . Dado el tamaño del esqueleto de los

participantes, es que esta reacción también se conoce como cicloadición [3+2]. En el Esquema N°41 se muestra una versión simple, que implica la reacción entre *N*-metilglicina (sarcosina), formaldehído y C₆₀ en tolueno a reflujo. Esta síntesis conduce a la formación del derivado de *N*-metilpirrolidina con un rendimiento de reacción de aproximadamente el 41%, que puede transformarse en un 82%, si se considera la cantidad de C₆₀ que se recupera.²⁶⁹⁻²⁷⁰ En el Esquema N°42 se ilustra el mecanismo de síntesis de la cicloadición 1,3-dipolar para obtener un derivado del fullereno C₆₀ indicándose los reactivos de partida con color rojo.

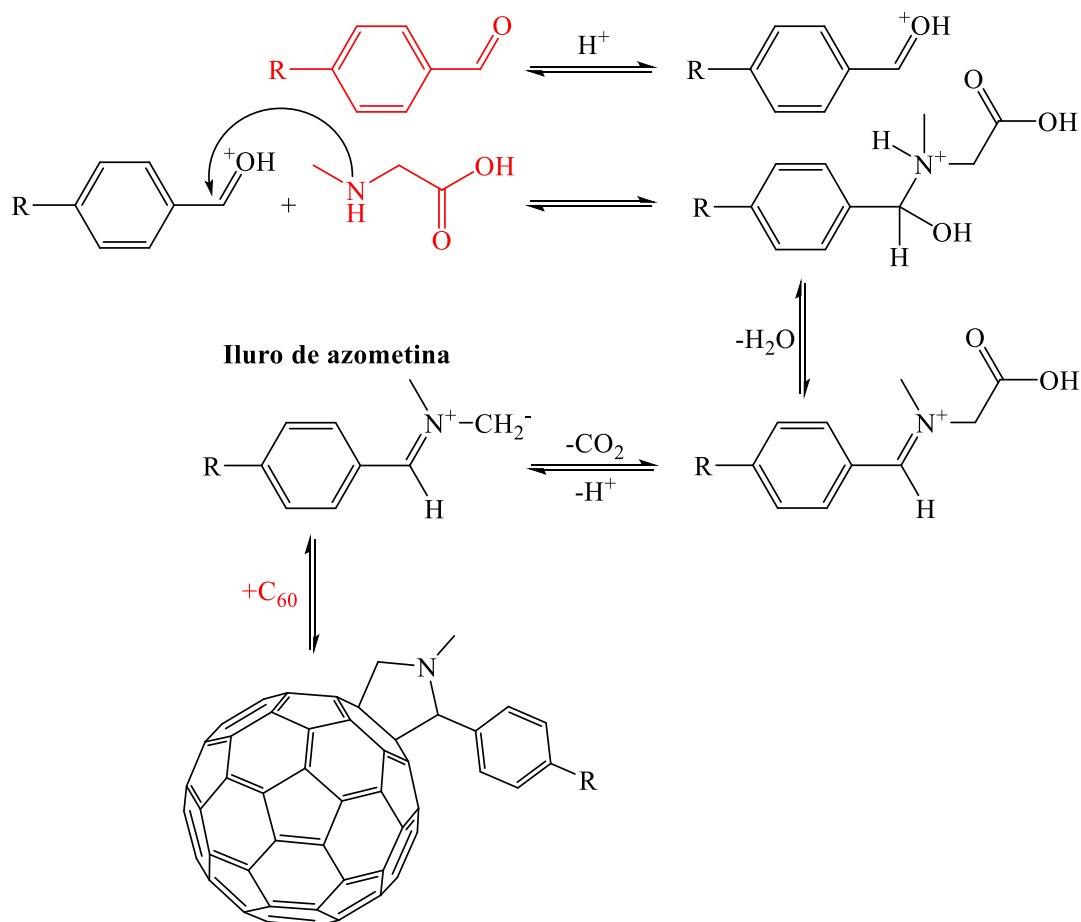


Esquema N°41. Síntesis de fulleropirrolidina a partir de la cicloadición [3+2] de iluro de azometino.

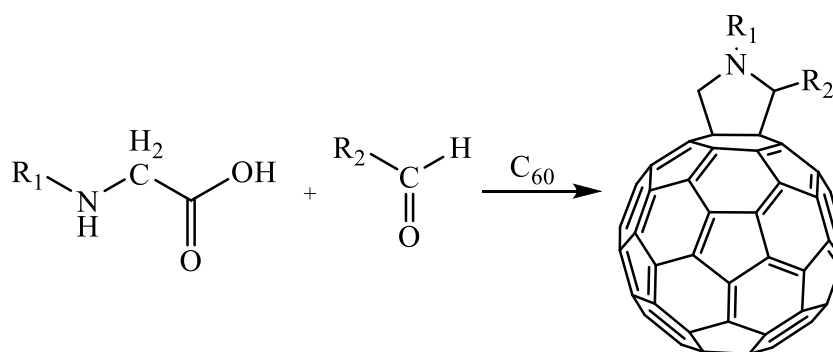
El alcance de esta reacción es muy amplio. El uso de un aldehído de partida diferente (también se pueden utilizar cetonas) permite la preparación de *N*-metil-3,4-fulleropirrolidinas-2-sustituídos.²⁷¹⁻²⁷² Por otro lado, la condensación de glicinas *N*-funcionalizadas con aldehídos da lugar a fulleropirrolidinas *N*-sustituídas (Esquema N°43).⁷⁸

La adición de iluros de azometino al C₆₀ a través de la ruta de descarboxilación es una metodología potente para la obtención de derivados funcionalizados del fullereno. Las principales ventajas son las siguientes: (1) la reacción conduce principalmente sólo al compuesto correspondiente a la monoaddición; (2) una amplia variedad de aminoácidos y aldehídos se encuentran disponibles comercialmente; (3) se pueden introducir simultáneamente dos cadenas funcionales.²⁷³

La ventaja número tres de las antes mencionadas, ofrece la posibilidad de incorporar en un solo paso, tanto la funcionalidad que deseemos combinar con el C₆₀ como un complemento para mejorar su solubilización. Un ejemplo consiste en agregar sustituyentes con cargas positivas a los derivados del fullereno obtenidos.^{85, 171, 197, 274} Estos pueden ser fácilmente metilados para generar derivados catiónicos, que como se expresó anteriormente, resultan más activos y eficientes para la inactivación microbiana.



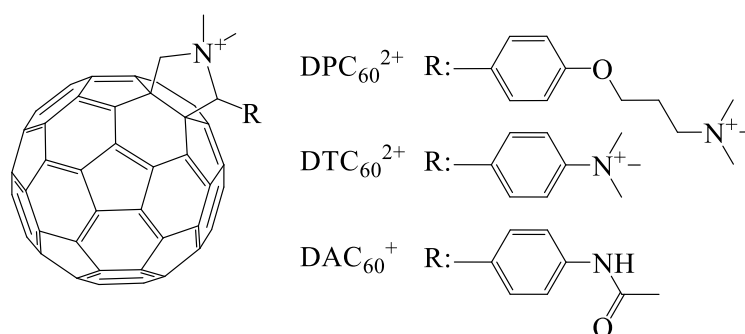
Esquema N°42. Mecanismo de síntesis de la cicloadición 1,3-dipolar para obtener derivados del fullereno C₆₀ con anillos pirrolidinios.



Esquema N°43. Síntesis de distintos derivados de fulleropirrolidinas a partir de la cicloadición [3+2] de iluro de azometino.

Durantini y col. sintetizaron distintos derivados del fullereno con diferentes grupos funcionales unidos covalentemente al C₆₀ mediante anillos pirrolidinios. En el año 2008, se obtuvo el fotosensibilizador *N,N*-dimetil-2-(40-*N,N,N*-trimetilaminofenil)fulleropirrolidinio (DTC₆₀²⁺) mediante una cicloadición 1,3-dipolar empleando como reactivos 4-(*N,N*-dimetilamino)benzaldehído, *N*-metilglicina y fullereno C₆₀ (Esquema N°44).¹⁷¹ Utilizando

la misma metodología, se sintetizó el compuesto monocatiónico *N,N*-dimetil-2-(40-acetamidofenil)fulleropirrolidinio (DAC_{60}^{+}).¹⁷¹ En el año 2015, se obtuvo *N*-metil-2-[4-(3-*N,N*-dimetilaminopropoxi)fenil]fulleropirrolidino y mediante una metilación exhaustiva con sulfato de dimetilo se adquirió el mismo compuesto con dos cargas positivas (DPC_{60}^{2+}) cuya estructura se muestra en el Esquema N°44.¹⁹⁷ Todas estas moléculas resultaron eficientes para la PDI de bacterias.



Esquema N°44. Estructura de fullerenos C_{60} catiónicos con actividad antimicrobiana.

1.3.2.4. Características espectroscópicas

Los fullerenos se caracterizan por presentar fuertes absorciones en la región UV y bandas más débiles, en la región visible.²⁷⁵ Como se muestra en la Figura N°7, el espectro de absorción del C_{60} presenta una banda intensa por debajo de los 400 nm (~ 300 nm, $\epsilon \sim 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y una banda ancha entre los 450 y 650 nm, centrada a ~ 550 nm con un $\epsilon \sim 1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, responsable del color magenta de una solución de C_{60} .^{254, 276}

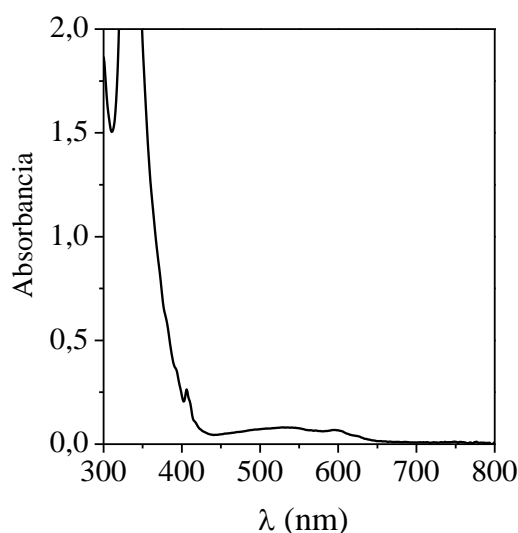


Figura N°7. Espectro de absorción de fullereno C_{60} en DMF.

Cuando el C_{60} es funcionalizado, se conservan las características espectroscópicas básicas, pero la absorción de los derivados se extiende aún más en la región del infrarrojo cercano. En este sentido, las propiedades electrónicas de los fulleropirrolidinas son las típicas de la mayoría de los fullerenos monosustituídos.

Análogamente al C_{60} , los espectros electrónicos de estos derivados están dominados por fuertes absorciones en la región UV. La absorción en el ultravioleta presenta una pequeña disminución de la intensidad que la correspondiente al fullereno sin sustituir.²⁷⁷

En la región visible del espectro, los fullerenos muestran un rango amplio de absorción, llegando hasta ~800 nm, presentando un pico agudo a 430 nm, y una banda más amplia en torno a los 700 nm.²⁷⁵ En la Figura N°8 se muestra el espectro de absorción del derivado fulleropirrolidina DTC_{60}^{2+} cuya estructura se presentó en el Esquema N°48.¹⁷¹

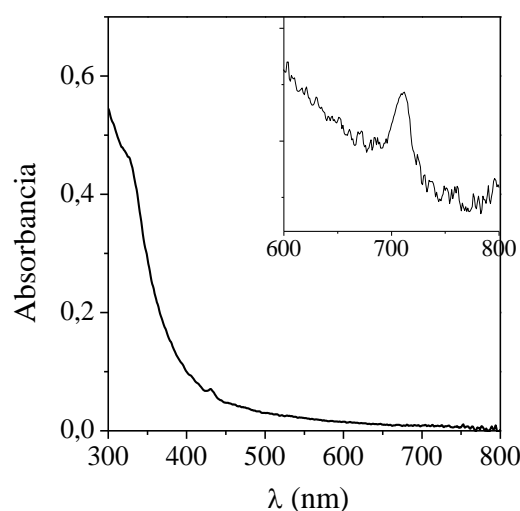


Figura N°8. Espectro de absorción de DTC_{60}^{2+} en DMF.

Esta absorción principal de los fullerenos en las regiones ultravioleta y visible del espectro, presenta una desventaja en relación a otros fotosensibilizadores. Los espectros de absorción de fotosensibilizadores tetrapirrólicos distintos a porfirinas (por ejemplo, clorinas, bacterioclorinas y ftalocianinas),¹⁶²⁻¹⁶³ se han diseñado para tener picos de absorción relevantes en la zona infrarroja del espectro, con el fin de reducir al máximo la dispersión y absorción de la luz por los tejidos. Es la ventana fototerapéutica la zona espectral tan deseada para aplicaciones de PDI (Figura N°4).^{70, 278-279} Dado que los fullerenos presentan escasa absorción en dicha zona del espectro, se piensa que estos compuestos pueden actuar más eficientemente como fotosensibilizadores cuando no sea indispensable una relevante absorción en tal región del espectro, como por ejemplo, en el tratamiento de infecciones superficiales y localizadas tales como heridas, quemaduras en la piel y en las mucosas, donde

la luz no necesita penetrar más de 1 mm.^{17, 71} Por otro lado, esta desventaja puede superarse o reducirse utilizando varias estrategias, como por ejemplo, uniendo covalentemente al fullereno antenas captadoras de luz²⁸⁰⁻²⁸² o mediante el uso de agentes de compensación ópticos.²⁸³⁻²⁸⁴

En lo que respecta a la emisión de fluorescencia, los derivados del fullereno C₆₀ presentan una escasa emisión con bajo rendimiento cuántico ($\Phi_F = 1,0 \times 10^{-4} - 6,0 \times 10^{-4}$).²⁸⁵⁻²⁸⁶ El espectro de fluorescencia de *N*-metilfulleropirrolidinas se encuentra en excelente acuerdo con su espectro UV-visible.^{277, 287} Esto refleja el hecho que las constantes de fuerza de los niveles de vibración en el primer estado excitado singlete se asemejan a las del estado fundamental singlete. En la Figura N°9 se muestra el espectro de emisión de DTC₆₀⁺² en DMF.¹⁷¹ Estos espectros presentan una banda centrada en 712 nm, que es característica de fulleropirrolidinas. Teniendo en cuenta el buen acuerdo entre la absorción de más larga longitud de onda y la emisión de longitud de onda más corta, esta banda puede asignarse a la banda de transición 0-0.⁵¹

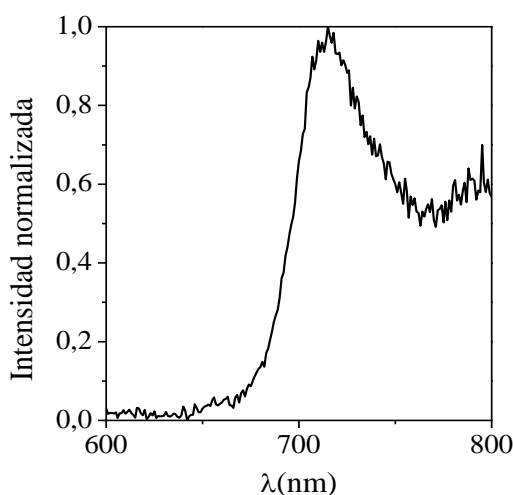
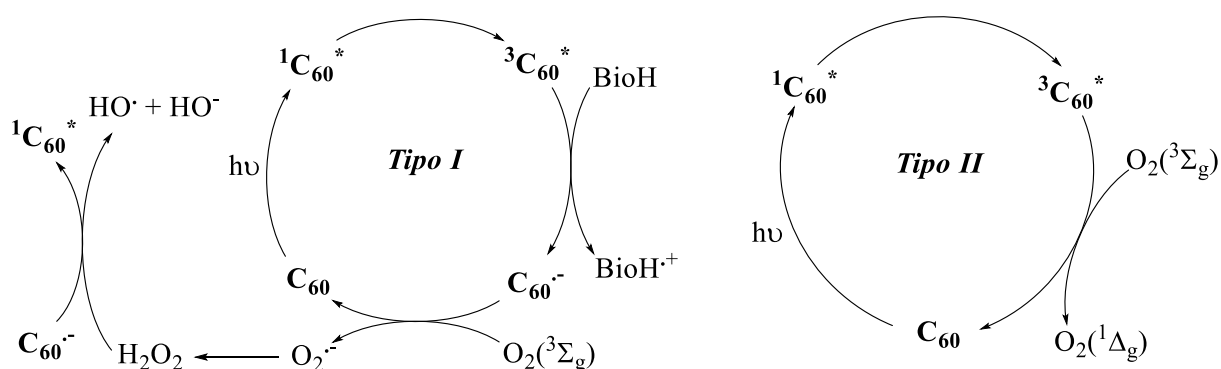


Figura N°9. Espectro de emisión de DTC₆₀²⁺ en DMF.

1.3.2.5. Propiedades fotofísicas

Cuando el C₆₀ se irradia con luz visible, es excitado desde su estado fundamental (¹C₆₀) al primer estado excitado singlete (¹C₆₀^{*}) de corto tiempo de vida (~1,3 ns).²⁷⁵ Además de perder energía por emisión de fluorescencia o conversión interna, el estado ¹C₆₀^{*} sufre predominante y rápidamente un entrecruzamiento al estado excitado triplete (³C₆₀^{*}) de larga vida (50-100 μs), con un rendimiento cercano a la unidad.²⁸⁸⁻²⁸⁹ Este proceso es prohibido por spin y posee una alta constante de velocidad ($5,0 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$), impulsado por un eficiente acoplamiento spin-órbita.^{275, 290}

Bajo condiciones aeróbicas, el $^3\text{C}_{60}^*$ del fullereno puede interactuar con oxígeno molecular en estado fundamental para formar ROS. Este proceso puede ocurrir por la transferencia de energía desde el $^3\text{C}_{60}^*$ para producir $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, o por la transferencia de electrones para formar $\text{O}_2^{\cdot-}$.²⁹¹ El fullereno C_{60} es un gran generador de oxígeno singlete ($\Phi_\Delta \sim 1$).^{289, 292-293} Por otro lado, el $^3\text{C}_{60}^*$ o $\text{C}_{60}^{\cdot-}$ pueden transferir un electrón al oxígeno molecular formando $\text{O}_2^{\cdot-}$. En contraste a la generación de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, que predomina en solventes orgánicos, tales como benceno y benzonitrilo, el tipo de reacción de transferencia de electrón tiene lugar preferentemente en solventes polares, especialmente en la presencia de agentes reductores tales como el NADH.²⁹⁴ Estas dos vías, la de producción de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$, son análogas a los dos tipos principales de fotoprocesos conocidos como los mecanismos fotoquímicos de tipo II y tipo I (Esquema N°45).²⁹⁵ Así, los C_{60} producen ROS mediante ambas vías fotoquímicas, mientras que las porfirinas generan estas especies principalmente a través de la vía fotoquímica tipo II.



Esquema N°45. Representación esquemática de los mecanismos fotoquímicos tipo I (transferencia de carga) y tipo II (transferencia de energía) de fullereno C_{60} . Adaptado de referencias 296 y 297.

Los fullerenos son conocidos por ser excelentes aceptores de electrones, son capaces de aceptar hasta seis electrones.²⁹⁸ Existe cierta evidencia de que el fullereno en estados excitados (en particular, el triplete) son aún mejores receptores de electrones que en el estado fundamental.^{275, 299} Por esto, se piensa que el triplete del fullereno reducido o el radical anión, pueden transferir un electrón al oxígeno molecular en estado fundamental formando el radical anión superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$.²⁹¹

1.3.3. Díadas porfirina-fullereno C_{60}

1.3.3.1. Propiedades generales

Una alternativa interesante de nuevos compuestos para ser evaluados como agentes fototerapéuticos son las díadas formadas por estructuras con características dadoras y

aceptoras de electrones, tales como porfirinas unidas covalentemente a fullereno C₆₀ (P-C₆₀).³⁰⁰⁻³⁰¹ Dadas las propiedades fisicoquímicas de las porfirinas y los fullerenos C₆₀ (secciones 1.3.1.4. y 1.3.2.5), la unión covalente de ambos cromóforos permite aumentar la actividad fotodinámica para la fotoinactivación de sistemas biológicos, debido a que ambos mecanismos de fotorreacción pueden intervenir dependiendo de las condiciones del medio. Por un lado, pueden generar preferentemente O₂(¹Δ_g) y por el otro, estados de separación de carga fotoinducidos dependiendo de la estructura y del microentorno en que se localiza.³⁰²⁻³⁰³ Además, la porfirina actúa como una antena captadora de energía, lo que aumenta la absorción del fullereno C₆₀, y de la díada, en la zona visible del espectro electromagnético.

En general, la producción de O₂(¹Δ_g) disminuye a medida que aumenta la polaridad del medio. Sin embargo, se forma un par iónico por fotoinducción que presenta un tiempo de vida suficientemente largo como para reaccionar con sustratos capaces de intervenir en procesos de oxidación-reducción.³⁰⁴ Así, estas díadas pueden ser fotosensibilizadores interesantes, debido a la posibilidad de competir eficientemente por un proceso de fotoreacción tipo I o II dependiendo de las condiciones del medio. En particular, en el fotoproceso tipo I el estado de separación de carga de la díada puede interactuar BioH dador o aceptor de electrones, dando lugar a la formación de aniones o cationes radicales de alta reactividad.

En estudios previos, una díada porfirina-fullereno C₆₀ (P-C₆₀) y su complejo con Zn(II) (ZnP-C₆₀) se evaluaron por primera vez como agentes fototerapéuticos para PDT.³⁰⁴⁻³⁰⁵ Estos compuestos presentan elevada capacidad de producir un estado de separación de cargas fotoinducido. Los estudios *in vitro* en una línea celular de laringe carcinoma humano (Hep-2), mostraron que las díadas se incorporan rápidamente a las células. El efecto fotocitotóxico más elevado se encontró para P-C₆₀, la cual inactiva el 80% de las células después de una irradiación de 54 J cm⁻². Por otra parte, ambas díadas tuvieron la capacidad de inactivar células a baja concentración de oxígeno. Estos resultados indican que P-C₆₀, es un agente eficiente para inactivar células en medios aeróbicos y también en condiciones anóxicas, mediante una combinación de los mecanismos de fotoreacción tipo I y tipo II, dependiendo del microentorno en el cual se encuentre. Además, la díada P-C₆₀ resultó más efectiva para matar células Hep-2 que la PpIX formada endógenamente mediante la inducción con ácido aminolevulínico (ALA).⁸¹

Estos resultados de las díadas como agentes fototerapéuticos con uso potencial en PDT motivan el diseño, síntesis y estudios de estos compuestos con posibles aplicaciones en la PDI de microorganismos. No hay antecedentes del uso de las mismas como

fotosensibilizadores en la erradicación de microbios. Así, la sustitución adecuada en la periferia del macrociclo tetrapirrólico combinada con la estructura del fullereno podrían ser utilizadas para potenciar la acción fotodinámica.

1.4. Uso clínico de la PDI

La fotosensibilización se emplea en diferentes áreas de la medicina, siendo la más significativa el tratamiento de enfermedades neoplásicas.³⁰⁶⁻³⁰⁷ Sin embargo, en la actualidad la PDT está siendo aplicada en el área clínica para la erradicación de microorganismos aunque en muy poca medida.⁵¹ Hasta el momento, las investigaciones han avanzado considerablemente con respecto a la PDI en solución o *in vitro*. Sin embargo, pocos estudios se han realizado *in vivo* a pesar que están surgiendo resultados alentadores en la fase clínica II.³⁰⁸⁻³⁰⁹

Morley y col. determinaron que la PDI, puede ser empleada para reducir la carga bacteriana y conducir a la cicatrización acelerada de heridas en úlceras crónicas de pierna y de pie diabético producidas por bacterias en pacientes con esta enfermedad.¹²² El tratamiento se llevó a cabo con el fotosensibilizador 3,7-bis(*N,N*-dibutilamino)fenotiazina-5-io (PPA904) de manera tópica. Luego de 15 min de incubación, se irradió la herida con luz roja (50 J cm^{-2}) con el dispositivo que se muestra en la Figura N°10. En contraste con el placebo, los pacientes en tratamiento activo mostraron una reducción en la carga bacteriana inmediatamente después de finalizada la PDI. Pasados los 3 meses de tratamiento, el 50% de las personas con úlcera crónica de pierna, mostraron una curación completa en comparación con el 12% de los pacientes medicados con placebo.¹²²

Un segundo estudio en la fase clínica II, se llevó a cabo con 48 pacientes también con úlceras crónicas en la pierna. En 6 de ellos, se empleó la PDI una vez cada siete días durante 12 semanas.³⁰⁸ El objetivo principal de este estudio, consistió en determinar si la dosis repetida de la PDI puede causar la reducción del contenido bacteriano de las infecciones crónicas desarrolladas en la pierna. Con tal fin, se llevaron a cabo mediciones de la carga microbiana total de la úlcera inmediatamente antes (10^4 unidades formadoras de colonias (UFC)/g) y después de cada tratamiento. Los datos provisionales sobre 24 pacientes mostraron que 4 de 12 úlceras se cerraron por completo, en comparación con 0 de 12 úlceras en el grupo de placebo. Cabe destacar, que en las heridas habitaban diferentes especies de anaerobios: MRSA, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. La viabilidad celular resultó diferente para cada uno de estos microorganismos luego del mismo tratamiento.³⁰⁸



Figura N°10. Dispositivo PPA Lux 680 empleado para la irradiación de la zona infectada tratada con PPA904.³⁰⁸

La cavidad oral del hombre está colonizada por un gran número de comunidades bacterianas altamente diversas, conocidas colectivamente como "microflora oral normal".³¹⁰ La gran mayoría de los miembros de esta comunidad son inofensivos. Una peculiaridad de la cavidad oral, es que la mayoría de las bacterias que se encuentran allí, están presentes como biopelículas bacterianas en la superficie de los dientes, lo que se denomina "placa dental".³¹⁰ La acumulación de estas biopelículas en la superficie de los dientes resulta en caries que disuelven gradualmente el esmalte y la dentina subyacente. La carie dental, es una enfermedad crónica invasiva que implica la desmineralización del diente, seguida de la destrucción de la dentina.³¹¹ Es por ello, que se han realizado diversos estudios de inactivación fotodinámica para promover la muerte bacteriana.³¹²⁻³¹⁴ Lima y col. desarrollaron un estudio del efecto de la PDI en dentinas con microorganismos de la cavidad oral producidos *in situ*. La investigación se llevó a cabo con 20 voluntarios a los que se les colocó en sus paladares dentinas impregnadas con azul de toluidina.³¹⁵ Transcurrido los 14 días, las mismas se extrajeron e irradiaron durante 5 min (47 J cm^{-2}) y 10 min (94 J cm^{-2}). Se encontró una disminución en la viabilidad celular de 3,45 y 5,18 log para estreptococos, de 3,08 y 4,16 log para *Streptococcus mutans* y, de 3,24 y 4,66 log para lactobacilos.³¹⁵ Este ensayo pone de manifiesto que la PDI puede ser empleada para el tratamiento de caries dentales.

La presencia de microorganismos sobre la superficie de los implantes dentales ocurre rápidamente tras la exposición a la cavidad bucal, pudiéndose producir peri-implantitis. Cuando la presencia de bacterias provoca cambios inflamatorios reversibles en los tejidos blandos que rodean el implante, y ésta a su vez afecta al hueso, se llama peri-implantitis.^{316,317} La PDI ha surgido recientemente como una terapia alternativa contra diferentes patógenos orales que causan peri-implantitis.³¹⁷ Actualmente, ya se encuentra disponible comercialmente el Set HELBO®, ampliamente empleado para combatir las infecciones dentales propensas a desarrollarse luego de la colocación de un implante

dental.³¹⁸⁻³²⁰ Este se basa en la inactivación fotodinámica y emplea fenotiazina como fotosensibilizador. Se obtuvieron tan buenos resultados, que ya se puede adquirir de modo independiente y emplear en el área clínica (Figura N°11). También, se están realizando estudios con el Set HELBO® en pacientes con enfermedades como diabetes tipo II, obteniéndose muy buenos resultados.³²¹ La investigación desarrollada hasta el momento, demuestra que el tratamiento con HELBO® es un modo eficaz y rápido para liberar al paciente de ciertos tipos de inflamaciones o infecciones así como para evitar interrupciones en la cicatrización de heridas.



Figura N°11. HELBO® Professional-Set Plus.³²¹

En el presente año, se llevó a cabo un estudio clínico para evaluar la eficacia de la PDI para erradicar hongos creciendo en el paladar de fumadores de cigarrillos y en no fumadores con estomatitis de dentadura postiza.³²² Se cree que los hidrocarburos aromáticos presentes en los cigarrillos actúan como nutrientes permitiendo el crecimiento y la proliferación de distintas especies de hongos en la boca.³²³ Además, el hábito del fumador, da lugar a alteraciones en el tejido epitelial lo que facilita el crecimiento de los microbios. Dentro de la boca de los pacientes, el hongo que se encontró en mayor proporción fue *C. albicans*. El estudio se llevó a cabo en 22 personas de sexo masculino (12 fumadores y 10 no fumadores) de 72 años de edad promedio que fumaban entre 12 y 20 cigarrillos por día. El fotosensibilizador empleado fue un derivado de la hematoporfirina llamado Photogem®.³²² Como fuente de irradiación se emplearon LEDs ($\lambda_{\text{emi}}=440$ nm y $\lambda_{\text{emi}}=460$ nm). La dentadura y la mucosa eritematosa, se rociaron con el fotosensibilizador y posteriormente se irradiaron durante 20 min (122 J cm^{-2}). Luego del tratamiento, se observó una notable disminución en la carga microbiana en los paladares de los pacientes. Sin embargo, pasado 90 días luego de la PDI, se volvieron a aislar hongos de la boca de los dolientes como producto de una recolonización.³²²

A comienzos del año 2017, se empleó la PDI para tratar una micosis profunda, sistémica y crónica presente en el paladar de una mujer de 39 años de edad con lupus eritematoso sistémico, una enfermedad autoinmunitaria.³²⁴ El microorganismo responsable de este tipo de infecciones es *Paracoccidioides brasiliensis*. Para su erradicación, se utilizó el fotosensibilizador azul de toluidina (37 mg/l). El sitio de la lesión se irradió con un láser que emite a 600 nm (100 J cm^{-2}).³²⁴ Cuarenta días después del inicio del tratamiento, la paciente mostró regresión total de la lesión oral y ausencia de síntomas dolorosos. Además, la PDI previno infecciones secundarias.³²⁴

1.5. Desinfección de aguas con PDI

La inactivación fotodinámica ha sido aplicada tanto en el área clínica como en el medio ambiente.^{122, 201, 325-327} Aunque se han realizado muy pocos estudios de esta segunda aplicación de la PDI, los resultados preliminares obtenidos a nivel de laboratorio sugieren que esta técnica fotoquímica tiene un gran potencial para ser aplicada en la desinfección de agua de diferentes plantas de tratamiento.^{325, 328-331} Si bien la transmisión de enfermedades microbianas se ha reducido en los países desarrollados, debido a mejoras en el suministro de agua y en los procedimientos higiénicos de distintas actividades humanas, es necesario nuevas tecnologías respetuosas con el medio ambiente para luchar contra la contaminación microbiana en aguas residuales.³²⁵

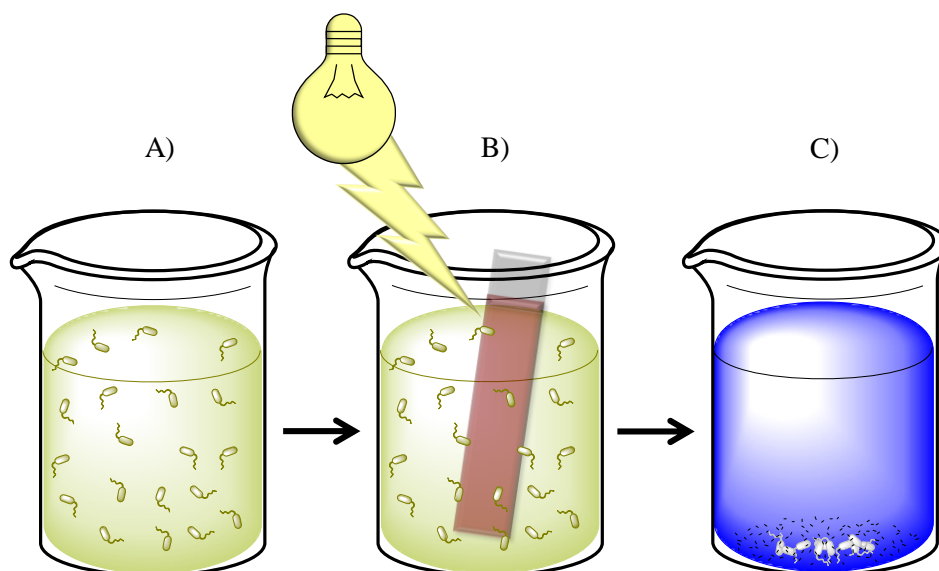
Para que la PDI sea una tecnología útil para ser empleada en la aplicación antes mencionada, algunos aspectos, pocos relevantes para la PDI en el área clínica, necesitan ser tomados en consideración. El primero de ellos, consiste en la eliminación del fotosensibilizador después de la fotoinactivación para evitar la contaminación del medio con este tipo de moléculas. Por otro lado, además de tener en cuenta la eficiencia del fotosensibilizador para inactivar microorganismos, es importante considerar la estabilidad de los mismos frente a la irradiación con luz natural o artificial.⁷⁰

1.5.1. Remoción del fotosensibilizador

La mayoría de los experimentos de PDI desarrollados en el laboratorio se realizaron con fotosensibilizadores disueltos en solución. Sin embargo, esta metodología no es adecuada para ser aplicada en la desinfección de aguas del medio ambiente, donde los residuos del fotosensibilizador no son aceptables. Esto se debe, a que no sólo quedan trazas residuales de estas moléculas sino que además, vuelve esta tecnología más cara. Es por ello, que es fundamental desarrollar una metodología que permita la reutilización de los

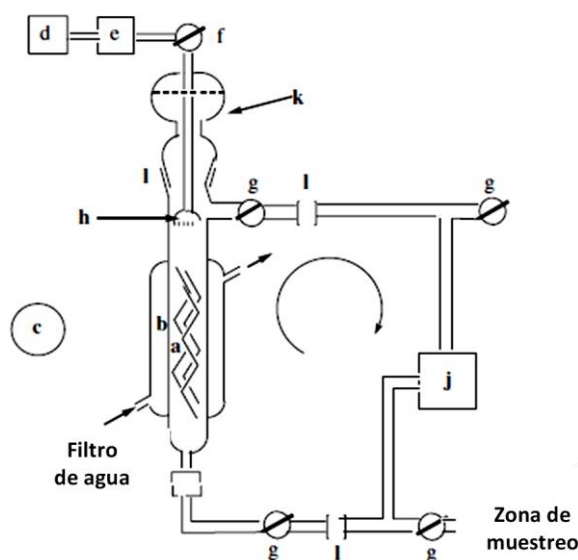
fotosensibilizadores.³³² Por otro lado, una desventaja inherente de la mayoría de los compuestos destinados a esta aplicación, es su alta solubilidad en agua, lo que hace que su eliminación sea extremadamente difícil.³³³⁻³³⁶ Por lo tanto, frente a las problemáticas antes planteadas, la inmovilización de los fotosensibilizadores en soportes insolubles puede ser un enfoque interesante para inactivar microorganismos patógenos presentes en las aguas ambientales. De hecho, ya se están desarrollando fotosensibilizadores inmovilizados sobre soportes sólidos o nanopartículas magnéticas (que pueden ser eliminadas con un imán), y se ha probado su eficacia en la fotoinactivación de bacterias fecales,^{330, 337-338} virus³³² y *S. aureus*³³⁹. Es interesante destacar que, en ciertas ocasiones, los resultados de PDI obtenidos con polímeros formados por fotosensibilizadores son similares a los encontrados con las mismas moléculas de forma libre.⁷⁰

La metodología propuesta para desinfectar agua, empleando un soporte polimérico con un fotosensibilizador inmovilizado, se resume en el Esquema N°46. En primer lugar se introduce la superficie antimicrobiana dentro del agua contaminada. Luego, se irradia el sistema con luz natural o artificial, lo que da lugar a la generación de ROS que producen un daño celular en los microorganismos patógenos. Finalmente, se elimina la superficie del agua, dejando la misma con una muy baja carga microbiana o en el caso ideal esterilizada. Los microbios inactivados, remanentes en el agua, pasan a ser el alimento de organismos acuáticos y/o forman parte de la demanda biológica de oxígeno (DBO).³⁴⁰⁻³⁴¹



Esquema N°46. Pasos de la PDI para inactivar microorganismos de aguas residuales. (A) Agua con microbios, (B) introducción de la superficie fotoinactivante e irradiación del sistema con luz artificial o natural lo que produce la muerte celular y (C) obtención de agua desinfectada.

Varios científicos han propuesto otras maneras de eliminar el fotosensibilizador excedente de las aguas residuales para después del tratamiento de desinfección empleando la PDI. Algunos, sugieren utilizar una columna de filtrado que adsorba el fotosensibilizador y logre efluentes incoloros.³⁴² Sin embargo, utilizando filtros de poro adecuado, es posible eliminar los microbios del agua sin necesidad de un fotosensibilizador.³⁴³⁻³⁴⁵ Otros, muestran resultados en los que la concentración residual de la molécula se eliminó completamente por adsorción en una columna de material adsorbente.³⁴² Sin embargo, es conveniente utilizar un reactor con un colorante inmovilizado con el fin de evitar preocuparse de la recuperación del fotosensibilizador disuelto después del tratamiento fotodinámico, dado que implica un gran gasto de tiempo y dinero. Los primeros en desarrollar un reactor con estas características fueron Bonnett y su equipo de trabajo.³³⁰ Construyeron membranas a base de quitosano con los fotosensibilizadores 5,10,15,20-tetrakis(*p*-hidroxifenil)porfirina, 5,10,15,20-tetrakis(*p*-aminofenil)porfirina y Zn(II) 2,9(10),16(17),23(24)-tetrakis(sulfonato)ftalocianina de sodio.³³⁰ La superficie fotosensibilizante se colocó en un sistema de flujo de agua a gran escala como se muestra en el Esquema N°47. Se observó que la viabilidad de *E. coli* se reduce significativamente de $2,0 \times 10^5$ a $8,3 \times 10^2$ UFC/ml después de 160 min de irradiación empleando una lámpara de halógeno de 500 W.³³⁰



Esquema N°47. Fotoreactor con circulación de agua para la determinación de la actividad antimicrobiana de membranas con actividad fotodinámica. a) Membrana antibacteriana en estudio; b) cámaras con agua de flujo continuo y filtros infrarrojos; c) fuente de irradiación; d) bomba de aire; e) filtro de aire bacteriano; f y g) tres vías para la liberación de presión; h) aireación; j) bomba peristáltica; l) juntas de vidrio para facilitar la limpieza y la esterilización. Adaptado de referencia 330.

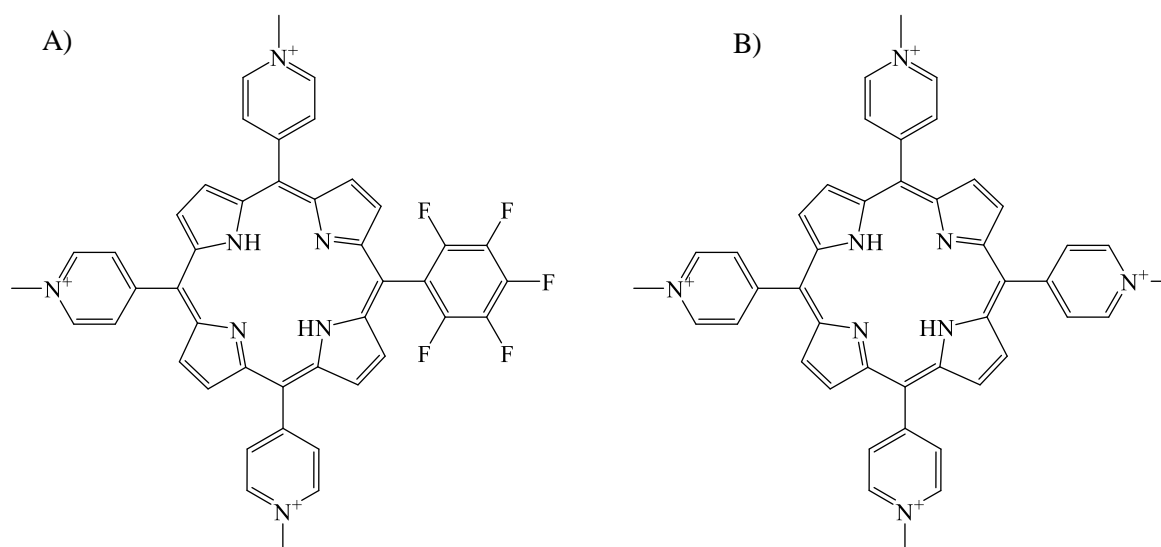
Los primeros estudios realizados con aguas ambientales demostraron que la inactivación microbiana empleando la PDI no es tan eficaz como en condiciones de laboratorio, en el que los microorganismos se suspenden en soluciones reguladoras de pH.⁷⁰ Sin embargo, es posible lograr una inactivación considerable de las cepas microbianas en aguas ambientales aumentando moderadamente la concentración del fotosensibilizador. Por lo tanto, es necesario tener en cuenta las características fisicoquímicas del agua para asegurar una desinfección exitosa haciendo uso de la PDI.

En el año 2011, Alves y col. verificaron que cambios en la temperatura (10-25 °C), la salinidad (2-4% NaCl), el pH (pH=6,5-8,5) y en la agitación del medio, no afectan la inactivación de *Vibrio fischeri* por tri-yoduro de 5,10,15-tris(1-metilpiridinio-4-il)-20-(pentafluorofenil)porfirina (Esquema N°48A) en condiciones de laboratorio.³⁴⁶ Por otro lado, probaron la eficacia del mismo fotosensibilizador en el tratamiento de agua de tanques de acuicultura, y llegaron a la conclusión de que la inactivación bacteriana es más eficaz en buffer fosfato salino (PBS) que en agua natural. Sin embargo, al eliminar la materia en suspensión del agua de acuicultura, el éxito de la PDI aumentó.³⁴⁶ La inactivación de las bacterias en estas aguas, se hizo posible con una concentración de porfirina muy elevada (50 µM).³⁴⁶ Por otro lado Alouini y col., encontraron que la fotosensibilización por tetratosilato de *meso*-tetrakis(1-metilpiridinio-4-il)porfirina (Esquema N°48B), de los huevos de helmintos en aguas residuales, se vio influenciada por la concentración de oxígeno disuelto, la calidad del agua y el tipo de huevos.³⁴⁷ Sin embargo, observaron que los sólidos en suspensión son el parámetro más influyente en la eficiencia del proceso fotoquímico. Esto se debe a que reducen la penetración de la luz, desactivan el fotosensibilizador y protegen los huevos de helmintos.³⁴⁷ En las aguas residuales hay ciertos compuestos orgánicos e inorgánicos que absorben la energía en longitudes de onda de 400-800 nm, lo que disminuye la intensidad de la radiación.³⁴⁷ Además, los fotosensibilizadores se unen a parte del material disuelto no permitiéndoles ejercer su accionar.³⁴⁷

Finalmente, el investigador Arrojado demostró en su tesis doctoral, que para una concentración similar de bacterias y llevando a cabo la inactivación fotodinámica en las mismas condiciones de temperatura, pH, salinidad y oxígeno disuelto, los resultados variaron de un año a otro y que éstos estaban en función del período de muestreo.³⁴⁸ En todos los casos, se logró una inactivación total de sólo el 50%. La baja eficacia de la PDI puede deberse a diferencias en la comunidad bacteriana y en la cantidad de materia en suspensión. Sin embargo, este científico demostró que al incrementar la concentración de porfirina

aumenta la eficiencia de la PDI en gran medida, alcanzándose una inactivación total de las bacterias cultivables.³⁴⁸

Por lo tanto, en función de los antecedentes que se tienen hasta el momento, para lograr inactivar microorganismos en aguas residuales empleando la PDI de manera exitosa, sería necesario agregar un paso adicional a la metodología planteada en el Esquema N°46, el cual consistiría en una filtración de los sólidos en suspensión.



Esquema N°48. Estructuras químicas de 5,10,15-tris(1-metilpiridinio-4-il)-20-(pentafluorofenil)porfirina (A) y *meso*-tetrakis(1-metilpiridinio-4-il)porfirina (T_4MPyP^{4+}) (B) empleadas para la desinfección de agua.

1.5.2. La luz del sol como fuente de irradiación

Para que la PDI pueda ser aplicada en el medio ambiente, es necesario considerar la luz solar como fuente de irradiación. En primer lugar, dado que la luz del sol penetra profundamente en columnas de agua, es posible una iluminación casi uniforme de grandes volúmenes de líquido. Este enfoque convierte a la PDI en una tecnología barata ya que se basa en el uso de una fuente de luz visible de bajo costo.

Como se puede observar en la Figura N°12, la distribución de las longitudes de onda del espectro solar se concentra entre 400 y 800 nm. Además, el 8% de la radiación solar corresponde a luz UV con $\lambda=400$ nm.³²⁵ Por otra parte, las porfirinas presentan una banda de absorción entre los 420-430 nm llamada banda *Soret*, que les permite interaccionar de manera muy eficiente con la luz azul del sol. Además, la luz de esta longitud de onda, presenta una potencia de máxima penetración en las aguas naturales.³⁴⁹ Así, las propiedades

antes mencionadas, hacen que las porfirinas catiónicas resulten ser las más eficaces para matar microorganismos presentes en aguas profundas.³⁵⁰

La luz solar como fuente de irradiación se ha empleado también con otros fotosensibilizadores, que no pertenecen a la familia de las porfirinas, para inactivar hongos que afectan a conidios (espora asexual inmóvil característica de ciertos hongos) con el objetivo de suplantar los fertilizantes que tanto afectan a la salud humana,³⁵¹ para la erradicación de bacterias creciendo en aguas rurales empleando un complejo de rutenio (II) inmovilizado en una silicona porosa³⁵² y, para reducir la contaminación microbiana de cultivos de lechuga cuando se usan efluentes de aguas residuales tratadas para el riego.³⁵³

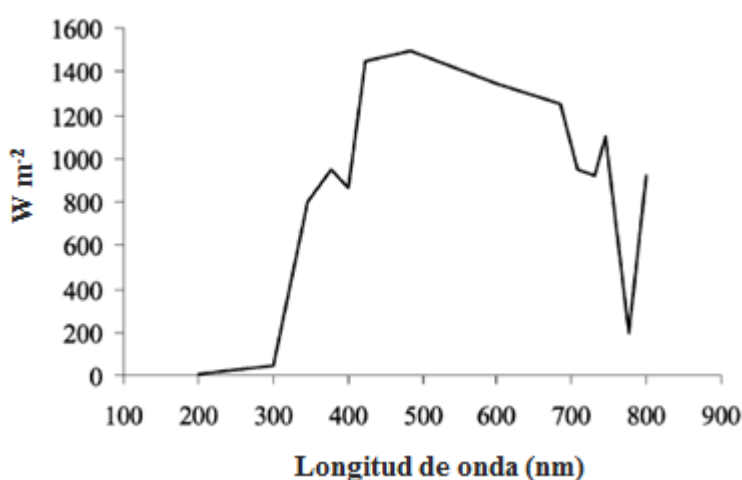


Figura N°12. Energía de la radiación solar en la superficie del mar.³²⁵

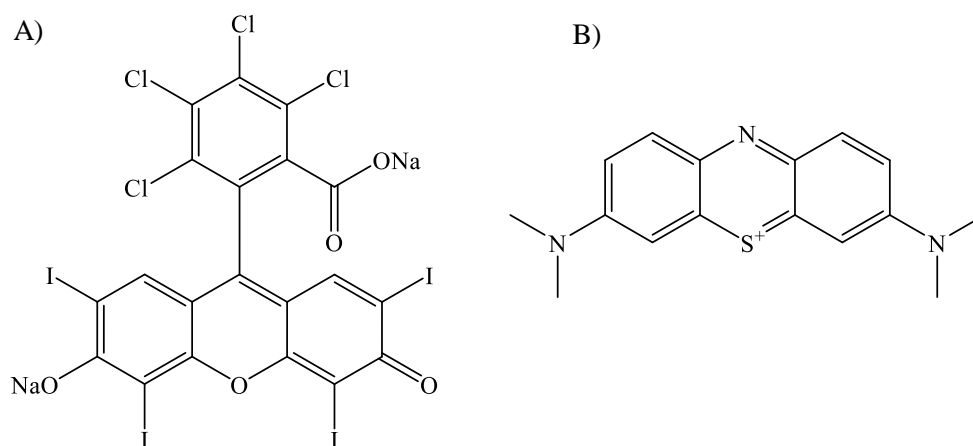
1.5.3. Estabilidad de fotosensibilizadores a la irradiación

Hasta el momento, se ha observado que las porfirinas *meso*-sustituidas libres, no se someten a biodegradación, ya que por factores estéricos, la interacción entre estas y el sitio activo de las enzimas, que participan en el catabolismo de la porfirina, está impedido.³⁵⁴ Jemli y col. corroboraron, que las porfirinas catiónicas son más fotoestables que los fotosensibilizadores rosa de bengala y azul de metileno, cuando se encuentran libres en aguas residuales y son irradiadas con luz solar.³²⁵ Los dos compuestos antes mencionados, han sido ampliamente estudiados y sus estructuras se muestran en el Esquema N°49.

Por otro lado Alves y col. y Costa y col., observaron que las porfirinas tri y tetracatiónicas son fotoestables bajo la irradiación solar durante 30 a 270 min y que también, son las más eficientes para inactivar microorganismos en aguas residuales.³²⁸⁻³²⁹ Cabe destacar, que distintos grupos de investigación han demostrado que la fotólisis de diferentes fotosensibilizadores da lugar a productos que no producen ningún efecto adicional en células

eucariotas. Esto último implica una ventaja de la PDI dadas, la cantidad de horas de exposición de las aguas residuales a la luz del sol y a que el agua tratada estaría destinada a consumo humano.^{325, 354}

En la actualidad, se están desarrollando superficies poliméricas con actividad antimicrobiana las cuales podrían ser empleadas para desinfectar agua.³⁵⁵⁻³⁵⁹ Sin embargo, es necesario considerar la posibilidad de lixiviación o fotodegradación de los fotosensibilizadores que forman parte de tales superficies. Este hecho, reduce el tiempo de vida útil de las superficies antimicrobianas volviéndose inactivas en poco tiempo.^{70, 360} Asimismo, algunos de los materiales fabricados con tal fin, necesitan períodos de iluminación mayores a 24 horas para poder eliminar de manera considerable la carga microbiana. Esto significa, que para lograr desinfectar agua se estaría necesitando un día completo de irradiación, lo cual hace que esta metodología se vuelva poco eficiente y que la superficie posea una elevada fotoestabilidad.



Esquema N°49. Estructuras químicas del rosa de bengala (A) y el azul de metileno (B).

1.5.4. Derivados de porfirinas como fotosensibilizadores eficientes para PDI

La eficiencia de los derivados de porfirinas ha sido comparada con la de otros fotosensibilizadores para ser aplicados en la PDI de microorganismos en aguas ambientales. Se ha demostrado, que las porfirinas catiónicas sustituidas en posiciones *meso* son más efectivas para matar microbios del medio ambiente, que otros fotosensibilizadores como el rosa de bengala y el azul de metileno (Esquema N°49). Por ejemplo, Jemli y col. compararon la PDI de coliformes fecales producida por la porfirina comercial T_4MPyP^{4+} (Esquema N°48B) con la llevada a cabo por los dos fotosensibilizadores antes mencionados.³²⁵ Esta metodología se utilizó para desinfectar aguas residuales en pequeña escala empleando la luz del sol como fuente de irradiación. Con la porfirina tetracatiónica T_4MPyP^{4+} se observó una

supervivencia de coliformes fecales de 2 y 1,5 log luego de 60 min de iluminación, empleando una concentración de fotosensibilizador de 5 y 10 μM , respectivamente. Luego de 240 min de irradiación, sólo se observó una supervivencia de 0,47 log independientemente de la concentración empleada.³²⁵ Por otro lado, se obtuvieron inactivaciones poco eficientes con los fotosensibilizadores rosa de bengala y azul de metileno. Por lo tanto, los resultados muestran que la porfirina es más efectiva que el rosa de bengala para inactivar bacterias fecales en aguas residuales y, que el azul de metileno es el más ineficiente de todos.³²⁵

Almeida y col. sostienen que las porfirinas tri y tetracatiónicas, libres o inmovilizadas en matrices sólidas, cuando se irradian con luz de longitud de onda adecuada, pueden inactivar eficazmente bacterias fecales Gram positivas y Gram negativas. Estos autores, utilizaron siete porfirinas catiónicas *meso* sustituidas para inactivar dos bacterias comúnmente presentes en heces, *Enterococcus faecalis* y *E. coli*.³²⁹ De estos estudios, pudieron concluir que la inactivación más eficiente de ambas bacterias se produjo en presencia de los fotosensibilizadores tri y tetracatiónicos cuyas estructuras se muestran en el Esquema N°48, respectivamente. La inactivación completa de las cepas bacterianas a baja potencia de luz (40 mW cm^{-2}), sugiere que la terapia fotodinámica antimicrobiana puede ser una posibilidad prometedora para el proceso de desinfección de aguas residuales en condiciones de luz natural. Los mismos autores, informaron un método más rápido y simple para controlar el proceso de fotoinactivación utilizando una cepa de *E. coli* recombinante bioluminiscente como indicador.³⁶¹ Los mejores resultados de PDI de este microorganismo se encontraron con la porfirina tricatiónica del Esquema N°48B.³⁶¹

1.5.5. Acción fotodinámica de superficies fotoinactivantes

Debido a que en las superficies fotoinactivantes el fotosensibilizador es insoluble y está inmovilizado, las interpretaciones mecanicistas de estos experimentos deben tener en cuenta la generación de especies reactivas en la superficie de la película, seguido por su difusión y eventual interacción con los microorganismos. Se considera que éstas superficies pueden actuar de dos maneras diferentes. La primera, consiste en un daño celular directo producido por las ROS generadas en la superficie de la película, que luego difunden para producir un daño celular en los microbios.³³⁰ Midden y col. fueron unos de los primeros en demostrar, que la fotoinactivación es debida a la difusión del $\text{O}_2(^1\Delta_g)$, quién al llegar a las células microbianas, produce daños en las membranas de las mismas ya que el fotosensibilizador no penetra en la célula bacteriana.³⁶² En la actualidad, diversos grupos de

investigación de distintas partes del mundo, están estudiando el mecanismo de acción de los polímeros antibacterianos poniendo en evidencia que las ROS se generan en la superficie de las películas poliméricas y que difunden hasta alcanzar las células microbianas.^{338-339, 363} El segundo mecanismo, consiste en la liberación lenta del fotosensibilizador desde la superficie hacia la suspensión microbiana de células.³³⁰ Sin embargo, este segundo mecanismo no sería aceptable en la desinfección de aguas, ya que cualquier fotosensibilizador liberado contaminaría las mismas. Por lo tanto, en la presente tesis se buscó, entre otras cosas, obtener superficies con el fotosensibilizador inmovilizado en la superficie de un sólido de manera irreversible, de modo que la inactivación fotodinámica sólo se produzca mediante el primer mecanismo de los antes propuestos.

1.5.6. Primeras superficies creadas para la desinfección de aguas

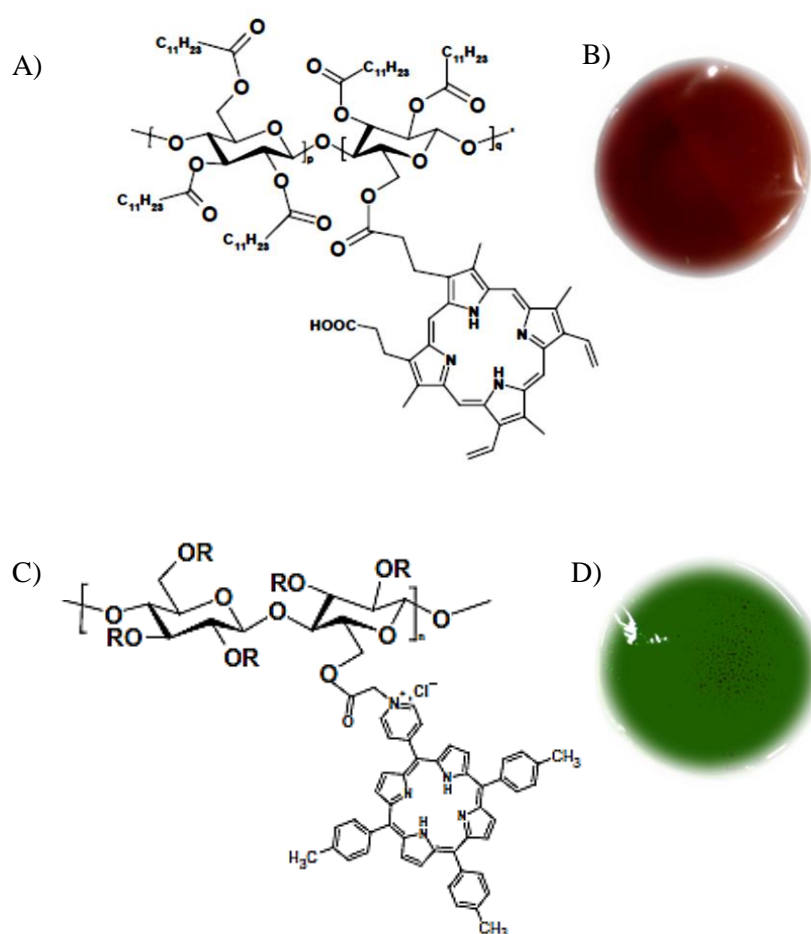
En 1977 Bezman y col., inmovilizaron rosa de bengala en perlas de poliestireno por unión covalente. Estas resultaron eficaces para matar el 99,99% de *E. coli* en muestras de agua contaminadas.³⁶⁴ Las perlas cargadas, se formaron mediante la adición del fotosensibilizador a 2,0 g de copolímero de estireno-divinilbenceno clorometilado en *N,N*-dimetilformamida. El polímero se lavó y se sometió a una extracción de Soxhlets para eliminar todo el fotosensibilizador no unido. Las perlas de color rojo oscuro, contienen entre un 15-20% de rosa de bengala.³⁶⁴ Para los estudios microbiológicos, se añadieron 200 mg de perlas a 75 ml de buffer fosfato salino con una concentración de *E. coli* de $\sim 4 \times 10^6$ UFC/ml.³⁶⁴ A continuación, se irradió el sistema entre 1 y 2 horas, utilizando 4 lámparas de 15 W ubicadas a 8 cm de la muestra, con agitación continua. La muerte celular se debió al fotosensibilizador inmovilizado que generó $O_2(^1\Delta_g)$ mediante un fotoproceso tipo II. Este resultado, se verificó con ensayos en agua deuterada.³⁶⁴

En 1984 Savino y col., encontraron que las muestras de agua contaminadas con *E. coli* podrían ser desinfectadas a niveles aceptables para el consumo humano. Este equipo, inmovilizó azul de metileno, rosa de bengala y eosina, mediante unión covalente a poliestireno, lo que se logró con un proceso de nitración, reducción y diazotization.³⁶⁵ Además, prepararon carbón activado granular y gel de sílice con azul de metileno. El carbón activado con el fotosensibilizador resultó ser el mejor soporte antibacteriano, dado que luego de 30 min de irradiación inactivó el 94,4% de los microorganismos.³⁶⁵

En 1999 Faust y col., construyeron un polímero de poli(metacrilato de metilo) que tiene unido covalentemente el fotosensibilizador Zn(II) 5-(4-perhidroxifenil)-10,15,20-

tris(*N*-metil-4-piridinio)porfirina y mostró tener un efecto inhibidor eficaz en la PDI de *Deinococcus radiodurans* en solución de fosfato buffer salino.³⁶⁶

Krouit y col. construyeron dos películas plásticas con celulosa y derivados de porfirinas, para producir la fotoinactivación de manera eficiente de *S. aureus* y *E. coli*.³⁶⁷⁻³⁶⁸ La celulosa es un polímero natural, estable y rígido que una vez esterificada permite dar lugar a materiales plásticos. En el año 2006, se fabricó la película de celulosa plástica con PpIX y en el 2008 una que contiene monopiridiltritililporfirina como fotosensibilizador.³⁶⁷⁻³⁶⁸ La estructura de los polímeros modificados y de las películas plásticas obtenidas por estos investigadores, se muestran en el Esquema N°50A-D.

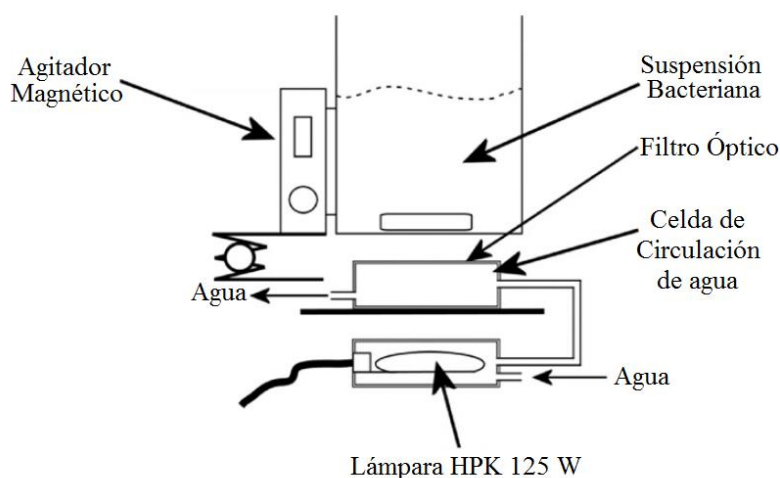


Esquema N°50. Estructura representativa de las películas de celulosa esterificadas con protoporfirina IX (PpIX) (A) y monopiridiltritililporfirina (C). Película de celulosa plástica con PpIX (B) y con monopiridiltritililporfirina (D).³⁶⁷⁻³⁶⁸

En el año 2009, se obtuvieron superficies antimicrobianas por polimerización electroquímica de 5,10,15,20-tetrakis(4-*N,N*-difenilaminofenil)porfirina (H₂P-película) y su complejo con Pd (II) (PdP-película) sobre electrodos transparentes de óxido de indio dopados con estaño comúnmente llamados ITO.³³⁸ Los estudios espectroscópicos de

absorción UV-visible muestran las bandas *Soret* y *Q* características de porfirinas. En los ensayos *in vitro*, se observó que estas películas son capaces de producir la PDI de bacterias Gram negativas y de levaduras creciendo en suspensiones acuosas. Luego de 30 min de irradiación con luz visible, se obtuvo una disminución en la supervivencia celular de *E. coli* y de *C. albicans* de 3 y 2,5 log, respectivamente. También, se notó que estas superficies producen un retraso en el crecimiento celular de ambos microbios.³³⁸ Por lo tanto, estos resultados indican que las porfirinas inmovilizadas en películas electropoliméricas resultan interesantes y versátiles para inactivar microorganismos presentes en suspensiones líquidas.

En el año 2011, se construyeron superficies formadas por gel de sílice comercial a la cual se le insertó fotosensibilizadores aromáticos.³⁶⁹ La superficie formada por 2-carboxil-9,10-antraquinona (ANT), mostró una notable actividad fotodinámica contra *E. coli* cuando se irradió, con luz visible ($\lambda > 340$ nm), el sistema se muestra en el Esquema N°51. Los autores estudiaron las ROS generadas y detectaron producción de $O_2(^1\Delta_g)$ y $O_2^{\bullet-}$ a quienes le atribuyen el efecto fotodinámico contra la bacteria Gram negativa comúnmente presente en aguas contaminadas.³⁶⁹ Este nuevo material es muy estable en suspensiones líquidas sin observarse un desprendimiento del fotosensibilizador de la superficie del material.



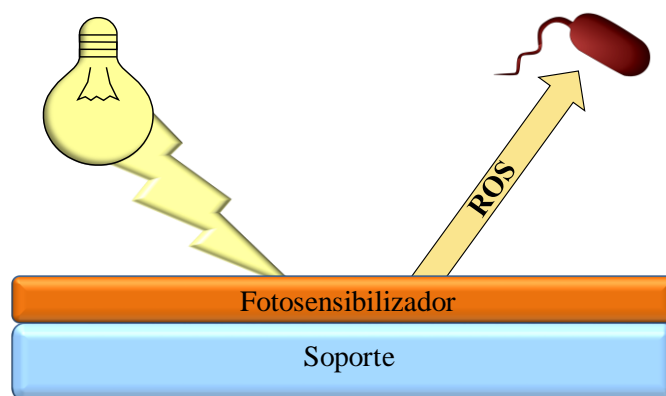
Esquema N°51. Representación del sistema empleado para desinfectar agua empleando sílica impregnada con el fotosensibilizador ANT. Adaptado de referencia 369.

1.6. Desinfección de superficies con PDI

En la actualidad, se busca el desarrollo de superficies con fotosensibilizadores inmovilizados, con el objetivo de alcanzar la esterilidad de distintas áreas o superficies. Esto se debe a que en los últimos tiempos, ha disminuido la susceptibilidad de diferentes microorganismos a los biocidas más comúnmente utilizados en los procesos de desinfección

de superficies.^{39-40, 370} Siempre que la superficie reciba una dosis de luz adecuada, las ROS generadas, pueden inactivar los microbios que lleguen a ese lugar. En estos sistemas se pretende que el fotosensibilizador no se consuma durante el proceso, por lo que continúa generando ROS, siempre y cuando se ilumine.³⁷¹ En efecto, el recubrimiento permitiría proporcionar una superficie de auto-desinfección, obviando así la necesidad de desinfectantes líquidos.³⁷¹ El revestimiento sería particularmente útil en áreas que reciben iluminación intensa, ya sea natural o artificial. Algunos ejemplos consisten en habitaciones de exploración y tratamientos médicos donde se recomienda una intensidad luminosa de 1000 lux ($0,15 \text{ mW cm}^{-2}$ a 555 nm), y en los quirófanos, donde la intensidad de la luz es alrededor de los 50.000 lux ($7,32 \text{ mW cm}^{-2}$ a 555 nm).³⁷¹ Cabe destacar que, además de tener en cuenta la eficiencia del fotosensibilizador para inactivar microorganismos, es importante considerar la estabilidad de las superficies frente a la irradiación con luz natural o artificial.

La metodología propuesta consiste en diseñar un soporte polimérico con un fotosensibilizador inmovilizado, el cuál formaría parte de paredes de hospitales o bandejas con instrumental quirúrgico. Dado que estas salas contienen iluminación permanente y de elevada potencia, por la actividad que allí se desarrolla, la superficie antibacteriana queda expuesta a la luz, lo que da lugar a la generación de ROS que producen un daño celular en los microorganismos (Esquema N°52). Esta nueva tecnología, reduciría la probabilidad de infecciones intrahospitalarias (sección 1.1.3.).



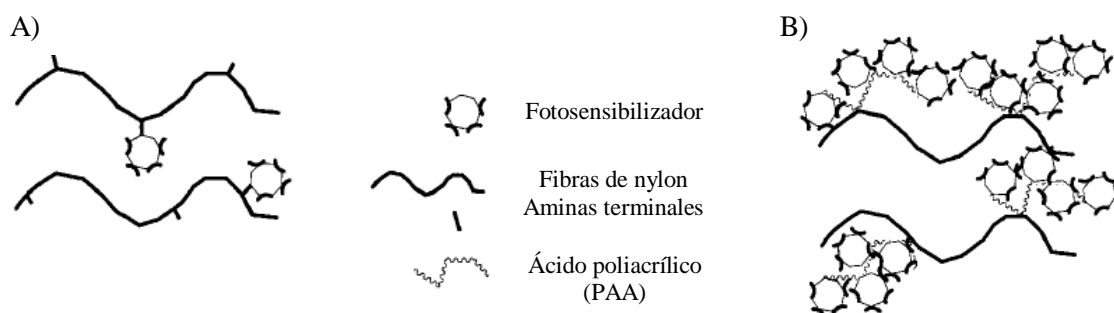
Esquema N°52. PDI para inactivar microorganismos creciendo en superficies.

1.6.1. Primeras superficies creadas para esterilidad permanente

En el año 1993 Bonnett y col., propusieron el desarrollo de materiales con actividad fotodinámica, con miras a la creación de una superficie que con la luz ambiente fuera capaz de mantener estéril distintas áreas.³⁷² Con este fin, se prepararon dos polímeros, uno de

celulosa y otro de poli(metacrilato de metilo) a base de los fotosensibilizadores 5,10,15,20-tetrakis(piridinio)porfirina y tetra(*tert*-butil)ftalocianina. La primera película presenta un máximo de absorción a 429 nm y la segunda a 615 nm.³⁷² Sin embargo, a pesar que estos polímeros pueden resultar muy buenos antimicrobianos, no realizaron estudios experimentales al respecto.

En el año 2003 Bozja y col., sintetizaron un material a base de nylon que contiene PpIX, de base libre y coordinada con zinc, las cuales están unidas a través del ácido poliacrílico como soporte (Esquema N°53B).³⁷³ Se encontró que estas superficies inactivan *S. aureus* y en menor medida *E. coli*, cuando se iluminan con luz ambiental. Los estudios *in vitro*, consistieron en sumergir fibras de 4 cm de largo en 3,0 ml de cultivos de *S. aureus* y *E. coli* con una absorbancia de 0,6 a 600 nm. Las mismas, se irradiaron durante 30 min con una fuente incandescente de una intensidad entre 10.000 y 60.000 lux (1,46-8,78 mW cm⁻² a 555 nm).³⁷³ Las fibras resultaron más activas contra *S. aureus* que *E. coli*. El mismo resultado se encontró utilizando la PpIX coordinada con Zn. Por los resultados obtenidos, los autores sugirieron posibles usos a este nuevo material, incluyendo cortinas de privacidad o batas de laboratorio para los hospitales.



Esquema N°53. Representación esquemática de la síntesis de: (A) fibras de nylon con pocos sitios de unión (-NH₂) y (B) la expansión de sitios de unión sobre las fibras de nylon por la adición de un puente poliacrílico que posee un gran número de sitios para unir covalentemente las porfirinas PpIX y ZnPpIX. Adaptado de referencia 373.

En el año 2006 Wilson y col., investigaron el potencial de un polímero formado por acetato de celulosa unido al fotosensibilizador azul de toluidina O (TBO) en la fotoinactivación de MRSA y *P. aeruginosa*, dos cepas aisladas de hospitales.³⁷¹ La especificación de cómo se fabrica la superficie no se da a conocer. Sólo se sabe que se recubrió un vidrio, empleado como soporte sólido, con una capa de acetato de celulosa con 0,005 mg/ml de TBO.³⁷¹ Las mismas se utilizaron para inactivar suspensiones celulares de ~10⁶ UFC/ml de los microorganismos antes mencionados. Las soluciones se expusieron a la

luz de una lámpara doméstica de 60 W que emite en la región visible del espectro. Para MRSA se logró una inactivación del 65%, 79% y 94% a las 8, 16 y 24 horas de irradiación, respectivamente. Por otro lado, para *P. aeruginosa* se logró una disminución en la viabilidad celular del 70%, 94%, 99,9% a los mismos tiempos de irradiación antes mencionados.³⁷¹ Esta inactivación es más que suficiente para hacerle frente a las densidades bacterianas encontradas en las superficies de los hospitales. Generalmente, en las habitaciones clínicas ocupadas por pacientes con infecciones se encuentra en las superficies entre $\sim 10^4$ - 10^7 UFC/ml de *S. aureus*.³⁷⁴ Tres años después, Wilson y col. informaron la eficacia de películas de acetato de celulosa, que contienen la combinación de dos fotosensibilizadores diferentes (TBO y Rosa de Bengala), para erradicar una gran variedad de microorganismos.³⁷⁵ Los estudios se llevaron a cabo con *S. aureus*, MRSA, *E. coli*, *C. albicans* y *Clostridium difficile* con una densidad de células de $\sim 10^6$ UFC/ml. Las superficies que contienen los fotosensibilizadores en una concentración de 25 mM, se irradiaron con luz visible desde 4 a 16 horas produciendo una disminución del 100% en el recuento viable de *S. aureus*, MRSA, *E. coli* y *C. difficile*. Sin embargo, se logró una inactivación del 88% para *C. albicans*.³⁷⁵ Por otro lado, este mismo grupo de investigación, demostró que polímeros de polisiloxano que contienen incrustadas nanopartículas de oro junto con azul de metileno, producen una reducción mayor a 3,5 log de MRSA y *E. coli* cuando se irradian durante 5 min a 660 nm.²¹²

En el año 2006 Wainwright y col., incorporaron distintos fotosensibilizadores derivados del azul de metileno en resinas poliméricas, para formar películas que han mostrado actividad antimicrobiana contra *S. epidermidis* y *E. coli*.³⁷⁶ Realizaron parches con un área de 20x80 cm² sobre los cuales se colocaron 10 ml de las suspensiones bacterianas que contienen $\sim 10^4$ UFC/ml. Posteriormente, se irradiaron con una lámpara de Paterson que emite entre 615-645 nm con una dosis total de luz entre 1,5-11,5 J cm⁻². Con la dosis más alta y con todas las concentraciones ensayadas (10-1000 μ M), se consiguió la inactivación total de *S. epidermidis* y *E. coli*.³⁷⁶

En el año 2009, el equipo de investigación de Zerdin unió covalentemente un derivado de antraquinona con un copolímero disponible comercialmente, el etileno-ácido acrílico.³⁷⁷ Las películas preparadas a partir de este material exhiben acción fotodinámica contra $\sim 7 \times 10^4$ esporas/ml de *Bacillus cereus* cuando se las expone a la luz UV de baja potencia. Esto se debe a la producción de O₂(¹ Δ_g) desde la superficie de la película.³⁷⁷

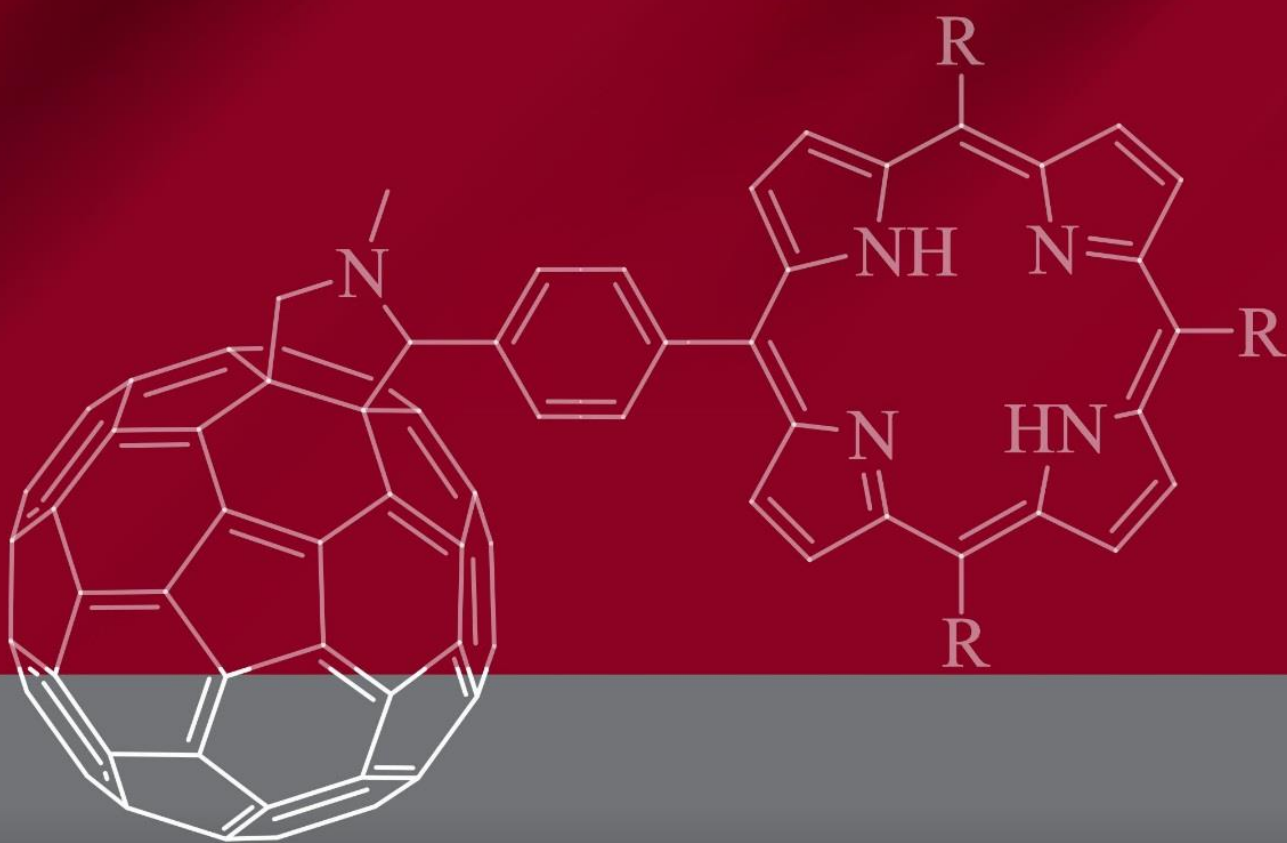
Finalmente en el año 2012, se construyeron por primera vez películas fotoactivas de polisilsesquioxano dopadas con 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(4-metilfenil)porfirina.³⁷⁸ Las películas obtenidas resultaron delgadas y flexibles (Figura N°13). Los estudios

espectroscópicos de absorción y fluorescencia mostraron las bandas características de la porfirina en la región visible, lo que indica que el fotosensibilizador se incorporó en las películas principalmente como monómero. De los estudios llevados a cabo *in vitro* con *C. albicans* creciendo en superficies, se observó que estas películas causan una disminución en la supervivencia de 2,5 log (99,7%) después de 60 min de irradiación con luz visible.³⁷⁸

En la actualidad, este tipo de materiales siguen en desarrollo con el objetivo de conseguir superficies estables a la luz y altamente efectivas para inactivar microorganismos. Además, se buscan técnicas que permitan la obtención rápida y económica de la superficie fotoactiva.^{339, 356, 363, 379}



Figura N°13. Fotografías de las películas de plástico de polisilsesquioxano sin dopar con el fotosensibilizador (A) y dopadas con 550 μl (B) y con 1100 μl (C) de una solución stock de porfirina 4×10^{-4} M en tetrahidrofurano.³⁷⁸



CAPÍTULO II

Objetivos

CAPÍTULO II

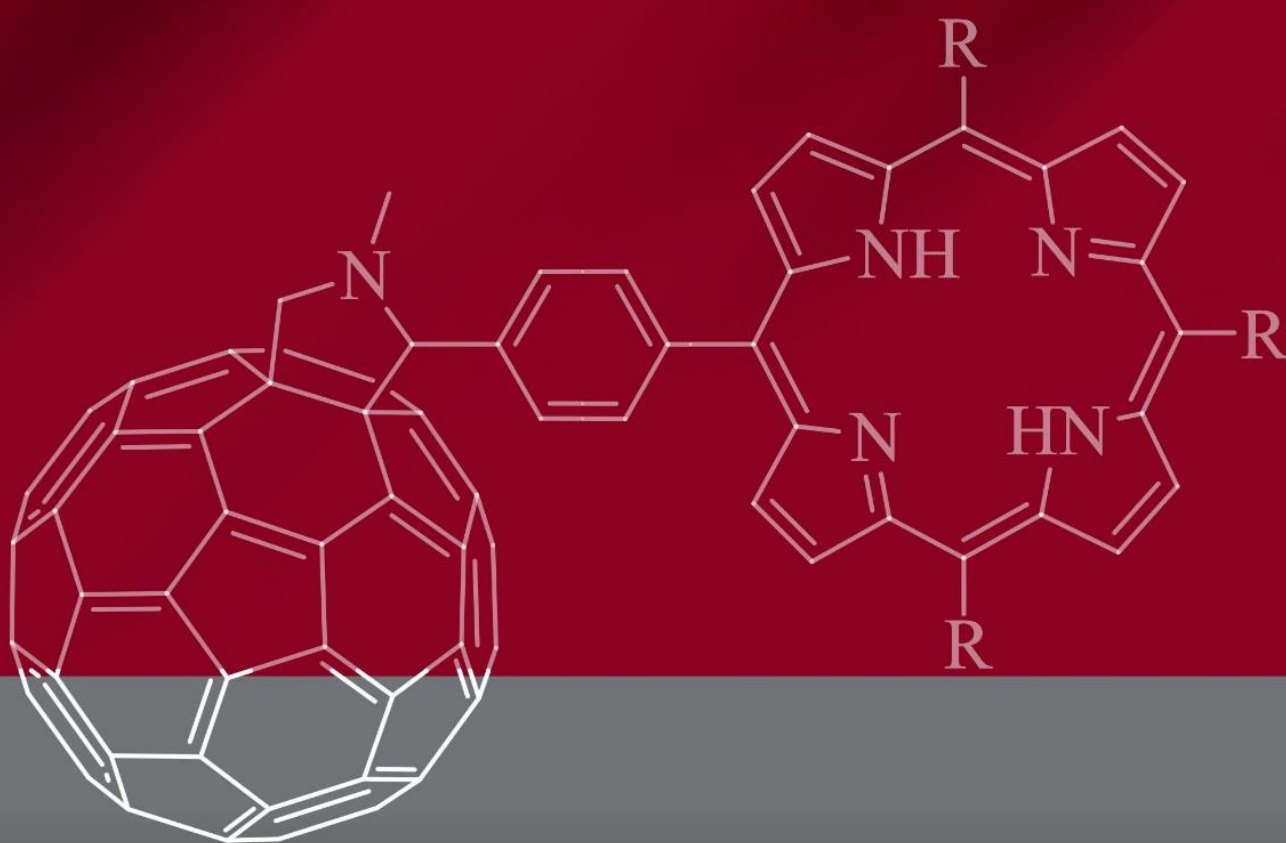
2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos generales

Diseñar, sintetizar y estudiar las propiedades fisicoquímicas de estructuras moleculares formadas por porfirinas y fullerenos C_{60} con aplicaciones en el desarrollo de nuevos agentes fototerapéuticos para la inactivación fotodinámica de microorganismos.

2.2. Objetivos específicos

- a) Sintetizar y caracterizar dipirrometanos sustituidos a partir de la condensación de pirrol con aldehídos.
- b) Sintetizar y caracterizar derivados de porfirinas sustituidos por un grupo aldehído en la periferia del macrociclo.
- c) Formar díadas moleculares combinando el derivado de porfirina con fullereno C_{60} .
- d) Determinar las características espectroscópicas de absorción y de fluorescencia de las moléculas sintetizadas.
- e) Estudiar las propiedades fotodinámicas de porfirinas, derivados del C_{60} y de díadas porfirina-fullereno C_{60} en diferentes medios y determinar sus características para la posterior aplicación como agentes fototerapéuticos en la inactivación de microorganismos.
- f) Investigar la capacidad de los fotosensibilizadores sintetizados para inactivar bacterias Gram positivas y Gram negativas en fase flotante libre.
- g) Preparar películas antimicrobianas con agentes fotosensibilizadores inmovilizados sobre un soporte polimérico mediante electropolimerización.
- h) Evaluar las características espectroscópicas de absorción UV-visible y de fluorescencia de los polímeros preparados.
- i) Estudiar las propiedades fotodinámicas de las superficies poliméricas en agua mediante la descomposición de sustratos.
- j) Investigar la capacidad de las superficies antimicrobianas para inactivar bacterias Gram positivas y Gram negativas en fase planctónica.
- k) Determinar si los polímeros electroquímicos producen la inactivación fotodinámica de biopelículas bacterianas.



CAPÍTULO III

Materiales y Métodos

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Equipamiento

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (^1H NMR) se obtuvieron en un espectrómetro multinuclear FT-NMR Bruker Avance DPX400 a 400 MHz. Los espectros de masa (MS) se tomaron con un Bruker MicroQTOFII (Bruker Daltonics, MA, E.E.U.U.) equipado con una fuente de ionización a presión atmosférica (APPI). Los espectros infrarrojo (FT-IR) se midieron con un Nicolet Impact 400 (Madison, WI, E.E.U.U.).

Los análisis de cromatografía gaseosa capilar acoplada a masa se realizaron en un GC-MS 5890 Series Gas Chromatograph Hewlett Packard equipado con una columna HP-5 Crosslinked 5% PH ME Silicone (30 x 0,32 mm x 0,25 μm Film Thickness, Hewlett Packard). Las cromatografías en capa fina (TLC) se corrieron en Uniplate Silica gel GHLF de 250 μm de Analtech (Newark, DE, E.E.U.U.), mientras que para las cromatografías en columna *flash* se utilizó gel de sílice (70-230 mesh, Merck Darmstadt, Alemania).

Los espectros UV-visible y de fluorescencia se registraron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC (Shimadzu Corporation, Tokio, Japón) y en un fluorómetro Spex FluoroMax (Horiba Jobin Yvon Inc, Edison, NJ, E.E.U.U.), respectivamente. Los espectros se midieron a $25,0 \pm 0,5$ °C utilizando una celda de cuarzo con un paso óptico de 1 cm.

La absorción de las suspensiones celulares se determinó a 660 ± 4 nm en un espectrofotómetro Barnstead Turner SP-830 (Dubuque, IA, E.E.U.U.).

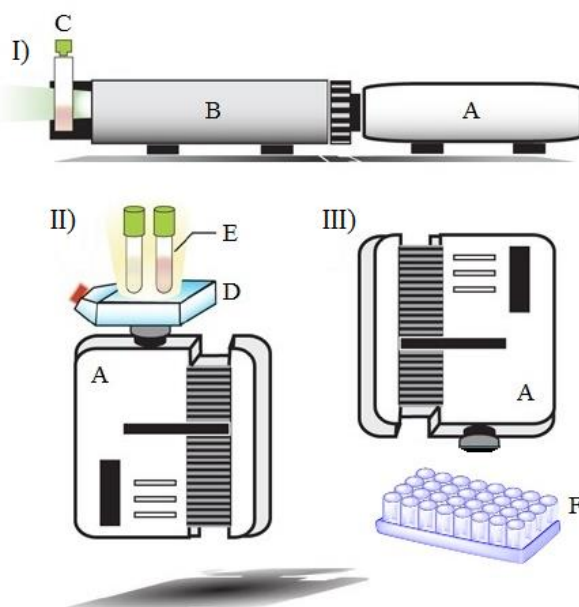
Los estudios con microorganismos se llevaron a cabo en tubos de ensayos y en placas de 24 y 96 pocillos (Deltalab, Barcelona, España).

Las imágenes microscópicas se tomaron en un microscopio trinocular Arcano L2001B YL con epifluorescencia (China) con un filtro de excitación de 410-490 nm y un filtro de emisión de 500-650 nm. También se utilizó un microscopio óptico Carl Zeiss Axiostar plus (Jena, Alemania). Las imágenes de las biopelículas bacterianas se tomaron en un microscopio confocal Olympus LEXT OLS 4000 (E.E.U.U.) y en un microscopio electrónico de barrido (SEM) Carl Zeiss-Sigma (E.E.U.U.).

3.2. Sistemas de irradiación

La irradiación de los distintos sustratos en medio homogéneo se realizó con un equipo Cole-Parmer illuminator 41720-series (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, E.E.U.U.) equipado

con una lámpara halógena de 150 W, acoplado a un monocromador (Photon Technology Instrument, Birmingham, NJ, E.E.U.U.) (Esquema N°54I). La intensidad de la luz en el sitio de tratamiento se determinó con un equipo Radiometer Laser Mate-Q Coherent (Santa Clara, CA, E.E.U.U.) y fue de $0,36 \pm 0,05 \text{ mW cm}^{-2}$ y $0,32 \pm 0,05 \text{ mW cm}^{-2}$ a 428 ± 5 y $434 \pm 5 \text{ nm}$, respectivamente. También, se llevaron a cabo medidas a $\lambda = 562 \pm 5 \text{ nm}$ y la intensidad de la luz en el sitio de tratamiento fue de $0,50 \pm 0,05 \text{ mW cm}^{-2}$.



Esquema N°54. Diferentes sistemas de irradiación. I) Fotooxidación de DMA, NBT y Trp. II) Inactivación de células de *S. aureus* en estado planctónico. III) Inactivación de *S. aureus* y *E. coli* en estado planctónico y de biopelículas de *S. aureus*. A: proyector, B: monocromador, C: celda de cuarzo, D: filtro de agua y E: suspensión de microorganismos, F: policubetas.

La irradiación de las distintas superficies poliméricas se llevó a cabo introduciendo la película en una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico y se empleó el equipo de irradiación con filtros ópticos (GG455 *cutoff filter*) para seleccionar un rango de longitud de onda entre 455-800 nm. La intensidad de la luz en el sitio de tratamiento se determinó con un radiómetro y fue de $44 \pm 2 \text{ mW cm}^{-2}$.

Para la irradiación de los sistemas biológicos se utilizó un proyector Novamat 130 AF (Braun Photo Technik, Nürnberg, Alemania) equipado con una lámpara de halógeno de 150 W. Se seleccionó mediante filtros ópticos, un intervalo de longitudes de onda entre 350-800 nm. La intensidad de la luz en el sitio de tratamiento se determinó con un radiómetro y fue de $90 \pm 2 \text{ mW cm}^{-2}$. Para los estudios *in vitro* llevados a cabo en tubos de ensayo, se empleó una cubeta de agua de 2,5 cm de ancho que actuó como filtro para absorber el calor de las

lámparas (Esquema N°54II). La misma estuvo ausente en los experimentos con microorganismos desarrollados en policubetas (Esquema N°54III).

3.3. Reactivos y solventes

Los compuestos químicos acetato de zinc (II), ácido *p*-toluensulfónico, ácido trifluoracético (TFA), azida de sodio (NaN_3), azul de nitrotetrazolio (NBT), bicarbonato de potasio (KHCO_3), carbonato de sodio (Na_2CO_3), β -caroteno, 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ), 9,10-dimetilantraceno (DMA), 4-[(3-*N,N*-dimetilamino)propoxil]benzaldehído, 2,2-dimetilpropano-1,3-diol, *N*-etil-3-carbazol-carboxaldehído, fullereno C_{60} , hidróxido de sodio, D-manitol, *N*-metilglicina (sarcocina), nicotinamida adenina dinucleótido (β -NADH), perclorato de tetra-*N*-butilamonio (TBAP), pirrol, sulfato de dimetilo, tereftaldicarboxaldehído y L-triptófano, provenientes de Aldrich se usaron sin purificación adicional. El surfactante bis(2-etilhexil)sulfosuccinato de sodio (AOT, Sigma, St. Louis, MO, E.E.U.U.) se secó bajo presión reducida. El compuesto 2,2'-(antraceno-9,10-diil)bis(metilmalonato) de sodio (ABMM), se sintetizó como se describe en trabajos previos.¹⁹³

El compuesto *N,N,N',N'*-tetrametil-1,1-naftidina (TMN) se obtuvo a partir de naftidina pura mediante una modificación del método de síntesis formaldehído-borohidrido previamente reportado.³⁸⁰

Los siguientes solventes (Sintorgan, Buenos Aires, Argentina) se utilizaron sin destilar: diclorometano (DCM), trietilamina (TEA), *N,N*-dimetilformamida (DMF), acetato de etilo, ciclohexano, metanol, etanol, tetrahidrofurano (THF), acetonitrilo (ACN), éter etílico, cloroformo, óxido de deuterio (D_2O), 1,2-dicloroetano (DCE) y *o*-diclorobenceno (*o*-DCB). En la síntesis de las díadas se utilizó tolueno (Aldrich), el cual se destiló sobre sodio metálico empleando acetofenona (Aldrich) como indicador y se conservó en tamices moleculares (Aldrich, poro 4Å) previamente activados. El agua ultra pura se obtuvo de un equipo Labconco (Kansas, MO, E.E.U.U.) modelo 90901-01. Se utilizaron solventes de calidad HPLC para estudios espectroscópicos y de grado GR para la síntesis de los diferentes compuestos.

3.4. Fotosensibilizadores

Las porfirinas 5,10,15,20-tetrakis(4-metoxifenil)porfirina (TMP) y 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenil)porfirina (TPPS^{4-}) provenientes de Aldrich se utilizaron sin

purificación adicional. Los fotosensibilizadores *N*-metil-2-fenilfulleropirrolidina (MPC₆₀), *N,N*-dimetil-2-(4'-acetamidofenil)fulleropirrolidina (DAC₆₀⁺), 5,10,15,20-tetrakis[3-(*N*-etil-*N*-metilcarbazoil)]porfirina (TCP⁴⁺), 5,15-bis[4(-*N,N*-difenilamino)fenil]-10,20-bis[3-(*N*-etilcarbazoil)]porfirina (PCBZTPA) y Zn(II) 5,15-bis[4(-*N,N*-difenilamino)fenil]-10,20-bis[3-(*N*-etilcarbazoil)]porfirina (ZnPCBZTPA) se sintetizaron como se describe en trabajos previos.^{162, 171, 242, 381}

3.5. Síntesis

3.5.1. *N*-Metil-2-(4-formilfenil)fulleropirrolidina (FC1)

La reacción entre tereftaldialdehído (15 mg, 0,11 mmol), sarcocina (15 mg, 0,11 mmol) y fullereno C₆₀ (80 mg, 0,11 mmol) se realizó en 60 ml de tolueno. La reacción se llevó a cabo a reflujo durante 5 h en atmósfera de argón. El compuesto de interés se purificó por cromatografía en columna *flash* utilizando gel de sílice como fase estacionaria y una elución por gradiente como fase móvil. Primero se separó el fullereno C₆₀ con tolueno puro y luego se obtuvo el producto con la mezcla de solventes tolueno/acetato de etilo 5%. Esta síntesis permitió obtener la molécula deseado, un sólido de color marrón con un 44% (42,9 mg) de rendimiento. ; TLC (tolueno) R_f=0,41; TLC (tolueno/acetato de etilo 5%) R_f=0,66. Los estudios espectroscópicos que confirman su estructura están de acuerdo con resultados reportados con anterioridad.^{171, 197}

3.5.2. *meso*-(*N*-Etil-3-carbazol)dipirrometano (DPM1)

El dipirrometano sustituido en la posición *meso* se sintetizó mediante la condensación de *N*-etil-3-carbazolcarbaldehído (1,01 g, 4,54 mmol) con un exceso de pirrol (50 ml, 722,75 mmol). Se agregó TFA (65 µl, 0,85 mmol) como catalizador de la reacción. La síntesis se llevó a cabo con agitación constante durante 25 min a temperatura ambiente en atmósfera de argón. Transcurrido el tiempo de reacción, se diluyó el medio con 80 ml de cloroformo. Luego, se realizaron lavados de 15 ml cada uno con NaOH 0,1 N hasta alcanzar un pH neutro. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y luego se removió el solvente usando evaporador rotatorio. El dipirrometano obtenido se purificó por cromatografía en columna *flash* empleando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil la mezcla ciclohexano/acetato de etilo/TEA (80:20:1). Las distintas fracciones obtenidas de la columna cromatográfica se secaron utilizando evaporador rotatorio con la posterior realización de vacío en desecador. Se obtuvo un sólido de color amarillo pálido con un rendimiento del

89% (1,36 g). TLC (TEA 1%/acetato de etilo 20%/ciclohexano) $R_f=0,42$. Los estudios espectroscópicos que confirman su estructura están de acuerdo con resultados reportados con anterioridad.^{162, 382}

3.5.3. Díada TCP-C₆₀. Metodología I

La condensación de *meso*-(9-etil-3-carbazolcarbo)dipirrometano (235,9 mg, 0,70 mmol) con 9-etil-3-carbazolcarbaldehído (36,3 mg 0,16 mmol) y FC1 (137,5, 0,16 mmol), dio lugar a la díada TCP-C₆₀. La reacción se llevó a cabo en bromobenceno (70 ml) con el agregado del ácido TFA (200 μ l, 2,61 mmol). La reacción se agitó durante 2 h en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Luego, la mezcla se oxidó con DDQ (163,4 mg, 0,72 mmol) durante 12 h en atmósfera de aire con agitación constante. Transcurrido dicho tiempo, se agregó 10 ml de metanol y se removió el solvente con rotavapor. Se llevó a cabo una filtración con gel de sílice y ciclohexano para remover el bromobenceno. Posteriormente, el producto de interés se purificó por cromatografía en columna *flash* (gel de sílice, tolueno/ciclohexano 20%/acetato de etilo 3%/TEA 1%) obteniéndose con un rendimiento del 8% (22,3 mg). La purificación no fue sencilla dado que la díada y la porfirina formada como subproducto, poseen R_f muy similares. TLC (tolueno) $R_f=0,52$ (porfirina) y $R_f=0,48$ (díada). TLC (CH₂Cl₂) $R_f= 0,78$ (porfirina) y $R_f= 0,80$ (díada).

3.5.4. 4-(4,4-Dimetil-2,6-dioxan-1-il)benzaldehído

La reacción entre tereftaldicarboxaldehído (1,09 g, 8,20 mmol) y 2,2-dimetilpropano-1,3-diol (0,85 g, 8,20 mmol) se realizó en 10 ml de tolueno utilizando como catalizador el ácido *p*-toluensulfónico (5 mg, 0,03 mmol). La reacción se llevó a cabo a reflujo durante 4 h en atmósfera de argón. El compuesto de interés se purificó por cromatografía en columna *flash* utilizando gel de sílice como fase estacionaria y DCM como fase móvil. Esta síntesis permitió obtener el compuesto 4-(4,4-dimetil-2,6-dioxan-1-il)benzaldehído, un sólido de color blanco, con un 45% (0,81 g) de rendimiento. Los estudios espectroscópicos que confirman su estructura están de acuerdo con resultados reportados con anterioridad.²⁴²

3.5.5. 5-(4-(5,5-Dimetil-1,3-dioxan-2-il)fenil)-10,15,20-tris[3-(*N*-etilcarbazol)]porfirina (P1)

La condensación de DPM1 (1,10 g, 3,24 mmol) con 4-(4,4-dimetil-2,6-dioxan-1-il)benzaldehído (355 mg, 1,61 mmol) y *N*-etil-3-carbazolcarbaldehído (289 mg, 1,29 mmol)

se utilizó para producir la porfirina asimétrica P1. Los reactivos antes mencionados se disolvieron en 365 ml de cloroformo y se purgó el medio de reacción con argón durante 30 min. Luego, se adicionó TFA (500 μ l, 6,50 mmol) como catalizador. Se agitó continuamente durante 30 min a temperatura ambiente en atmosfera de argón y en ausencia de luz. Posteriormente, se agregó TEA (1 ml, 7,20 mmol) y la mezcla se oxidó utilizando DDQ (2,50 g, 0,01 mol) y agitando durante 3 h en atmósfera de aire. Se adicionó 10 ml de metanol. El solvente se removió con presión reducida. La porfirina de interés se purificó por cromatografía en columna *flash* usando gel de sílice como fase estacionaria y llevando a cabo una elución por gradiente aumentado paulatinamente la polaridad de la fase móvil: primero ciclohexano/cloroformo (10:90), luego cloroformo puro y finalmente una mezcla de metanol/cloroformo (2:98). Se quitó el solvente de las distintas fracciones adquiridas de la columna bajo presión reducida lo que permitió obtener la porfirina deseada con un rendimiento del 18% (251 mg). TLC (cloroformo) R_f = 0,42. ^1H NMR (CDCl_3 , TMS) δ [ppm]: -2,48 (2H, pirrol NH); 0,92 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 1,29 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 1,69 (t, 9H, J =7,1 Hz, carbazol- CH_3); 3,85 (d, 2H, $-\text{CH}_2-$, J =10,8 Hz); 3,97 (d, 2H, $-\text{CH}_2-$, J =10,8 Hz); 4,63 (q, 6H, J =7,1 Hz carbazol- CH_2); 5,75 (s, 1H, $-\text{CH}-$); 7,31 (m, 3H, Ar carbazol); 7,59 (m, 6H, Ar carbazol); 7,76 (d, 3H, Ar carbazol, J =8,2 Hz); 7,93 (d, 2H, 5-Ar 3,5-H, J =7,9 Hz); 8,22 (d, 3H, Ar carbazol, J =8,0 Hz); 8,31 (d, 2H, 5-Ar 2,6-H, J =7,9 Hz); 8,38 (d, 3H, Ar carbazol, J =8,2 Hz); 8,88 (d, 2H, pirrol, J =5,0 Hz); 8,92 (m, 6H, pirrol); 8,99 (s, 3H, Ar carbazol). ESI-MS [m/z] 1080,4965 [$M+H$] $^+$ (1079,4887 calculado para $\text{C}_{74}\text{H}_{61}\text{N}_7\text{O}_2$).

3.5.6. 5-(4-Carbonilfenil)-10,15,20-tris[3-(*N*-etilcarbazoil)]porfirina (P2)

Se llevó a cabo una hidrólisis en medio ácido con el objetivo de desproteger la función aldehído de la porfirina asimétrica P1 y obtener así la 5-(4-carbonilfenil)-10,15,20-tris(*N*-etilcarbazoil)porfirina P2. Se empleó una mezcla de 6 ml de cloroformo, 6 ml de agua ultrapura y 5 ml de TFA. Se agitó el medio de reacción durante 30 h a temperatura ambiente en atmósfera de aire. Se desechó la fase acuosa. A la orgánica se le adicionó 10 mL de TEA. Luego, se realizaron dos extracciones de 8 ml cada una con agua ultrapura. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 . El solvente se removió bajo presión reducida seguida de vacío en desecador y se obtuvo el producto de interés con un rendimiento del 95% (228 mg). TLC (cloroformo/TEA 5%) R_f = 0,58. ^1H NMR (CDCl_3 , TMS) δ [ppm]: -2,50 (2H, pirrol NH); 1,68 (t, 9H, J =7,1 Hz, carbazol- CH_3); 4,63 (q, 6H, J =7,1 Hz carbazol- CH_2); 7,29 (m, 3H, Ar carbazol); 7,58 (m, 6H, Ar carbazol); 7,75 (d, 3H, Ar carbazol, J = 8,5 Hz); 8,28 (d, 2H, 5-

Ar 3,5-H, $J = 8,0$ Hz); 8,19 (d, 3H, Ar carbazol, $J = 8,0$ Hz); 8,44 (d, 2H, 5-Ar 2,6-H, $J = 8,0$ Hz); 8,34 (d, 3H, Ar carbazol, $J = 8,4$ Hz); 8,77 (d, 2H, pirrol, $J = 5,0$ Hz); 8,87-8,98 (m, 9H, pirrol y Ar carbazol), 10,37 (s, 1H, Ar-CHO). ESI-MS $[m/z]$ 994,4233 $[M+H]^+$ (993,4155 calculado para $C_{69}H_{51}N_7O$).

3.5.7. Díada TCP- C_{60} . Metodología II

La unión covalente de la porfirina P2 con el fullereno C_{60} se llevó a cabo mediante una cicloadición 1,3-dipolar en 150 ml de tolueno previamente destilado a partir de P2 (212 mg, 0,21 mmol), *N*-metilglicina (4,37 mg, 0,42 mmol) y fullereno C_{60} (158 mg, 0,22 mmol). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 18 h en atmósfera de argón. El producto de interés, se purificó por cromatografía en columna *flash* utilizando tolueno como solvente de elución. Este procedimiento permitió obtener una díada porfirina-fullereno C_{60} con un rendimiento del 62% (230 mg). TLC (tolueno) $R_f=0,53$. 1H NMR ($CDCl_3$, TMS) δ [ppm]: - 2,53 (2H, pirrol NH); 1,67 (t, 9H, carbazol- CH_3 , $J = 6,9$ Hz); 2,91 (s, 3H, N- CH_3 pirrolidina); 4,22 (d, 1H, pirrolidina, 9,0 Hz), 4,96-5,04 (m, 2H, pirrolidina 9,4 Hz); 4,62 (q, 6H, carbazol- CH_2 , $J = 6,9$ Hz); 7,30 (m, 3H, Ar carbazol); 7,58 (m, 6H, Ar carbazol); 7,74 (d, 3H, Ar carbazol, $J = 8,2$ Hz); 7,82 (d, 2H, 5-Ar 3,5-H, $J = 7,9$ Hz); 8,18 (d, 3H, Ar carbazol, $J = 8,1$ Hz); 8,27 (d, 2H, 5-Ar 2,6-H, $J = 7,9$ Hz); 8,35 (d, 3H, Ar carbazol, $J = 8,2$ Hz); 8,84-8,98 (m, 11H, pirrol y Ar carbazol). ESI-MS $[m/z]$ 1741,4706 $[M+H]^+$ (1740,4628 calculado para $C_{131}H_{56}N_8$).

3.5.8. Díada TCP- C_{60}^{4+}

Con el fin de obtener una díada catiónica, los grupos aminos presentes en la díada TCP- C_{60} se metilaron empleando un exceso de sulfato de dimetilo. La reacción se llevó a cabo usando como solvente el reactivo metilante (2 ml, 21,10 mmol) y agitando a 90 °C durante 44 h en atmósfera de aire. Posteriormente, se precipitó el producto de interés con éter etílico y se lo lavó con una solución de Na_2CO_3 al 5% y luego con agua ultrapura. Finalmente, se secó el producto bajo presión reducida y se obtuvo un sólido marrón con un rendimiento del 96%. FT-IR (KBr) ν [cm^{-1}]: 2976, 2937, 2874, 1595, 1470, 1400, 1230, 1166, 1037, 850, 806, 525. ESI-MS $[m/z]$ 1801,5645 $[M+H]^+$ (1800,5567 calculado para $C_{135}H_{68}N_8$).

3.5.9. Díada ZnTCP-C₆₀

La díada coordinada con el metal Zn se sintetizó disolviendo TCP-C₆₀ (20 mg, 0,011 mmol) en 7 ml de diclorometano. Luego, se agregó 2 ml de una solución saturada de acetato de zinc (II) en metanol. La mezcla se agitó durante 1 h en atmósfera de argón a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se siguió por espectroscopia de absorción UV-visible dado que a medida que disminuye la concentración de la porfirina base libre desaparecen 2 de las 4 bandas Q. Una vez finalizada la misma, se llevaron a cabo 3 extracciones con 15 ml de agua. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y luego se secó bajo presión reducida obteniéndose 20 mg (95%) de ZnTCP-C₆₀ puro.

3.5.10. *meso*-[4-(3-*N,N*-Dimetilamino)propoxil]dipirrometano (DPM2)

Se preparó una solución de 4-[(3-*N,N*-dimetilamino)propoxil]benzaldehído (2 ml, 10 mmol) y pirrol (15,0 ml, 216 mmol). La mezcla de reacción se agitó en atmósfera de argón durante 72 h a 85 °C. El avance de la síntesis se monitorizó por GC-MS. El exceso de pirrol se eliminó mediante evaporador rotatorio a temperatura ambiente y el producto se purificó mediante cromatografía *flash* (sílica gel, acetato de etilo/MeOH gradiente 5-10%/TEA 1%) para dar 55% (1,770 g, 5,468 mmol) del dipirrometano puro. TLC (sílica gel, acetato de etilo/MeOH/TEA 94/5/1) R_f =0,22. MS [m/z] 323,2 (M⁺) (323,1998 calculado para C₂₀H₂₅N₃O). Los datos espectroscópicos coinciden con los informados previamente.²³⁶

3.5.11. 5-(4-(5,5-Dimetil-1,3-dioxan-2-il)fenil)-10,15,20-tris[4-(3-*N,N*-dimetilamino)propoxil]porfirina (P3)

La condensación de DPM2 (1,32 g, 4,10 mmol) con 4-(4,4-dimetil-2,6-dioxan-1-il)benzaldehído (450 mg, 2,05 mmol) y 4-[(3-*N,N*-dimetilamino)propoxil]benzaldehído (340 mg, 1,64 mmol, 329 µl) se utilizó para producir la porfirina asimétrica P3. Los reactivos antes mencionados se disolvieron en 410 ml de ACN y se purgó el medio de reacción con argón durante 30 min. Luego, se adicionó TFA (8 ml, 100 mmol) como catalizador. Se agitó continuamente durante 30 min a temperatura ambiente en atmósfera de argón y en ausencia de luz. Posteriormente, se agregó TEA (14 ml, 100 mmol), la mezcla se oxidó utilizando DDQ (1,86 g, 8,2 mmol) y se agitó durante 3 h en atmósfera de aire. Se adicionó 15 ml de metanol. El solvente se removió con presión reducida. La porfirina de interés se purificó por cromatografía en columna *flash* usando gel de sílice como fase estacionaria y llevando a cabo una elución por gradiente aumentado paulatinamente la polaridad (DCM/MeOH

gradiente 0-20%/TEA gradiente 1-3%) (Figura N°14). Se quitó el solvente de las distintas fracciones adquiridas de la columna bajo presión reducida, lo que permitió obtener la porfirina deseada con un rendimiento del 10%. TLC (CHCl_3 /1% TEA/10% MeOH) $R_f=0,18$.



Figura N°14. Purificación de la porfirina P3 mediante cromatografía en columna *flash* (Silica gel, DCM/MeOH gradiente 0-20%/TEA gradiente 1-3%).

3.5.12. 5-(4-Carbonilfenil)-10,15,20-tris[4-(3-*N,N*-dimetilamino)propoxil]porfirina (P4)

Se llevó a cabo la hidrólisis de la porfirina asimétrica P3 en medio ácido con el objetivo de desproteger la función aldehído y obtener así la 5-(4-carbonilfenil)-10,15,20-tris[4-(3-*N,N*-dimetilamino)propoxil]porfirina (P4). Se empleó una mezcla de 6 ml de cloroformo, 6 ml de agua ultrapura y 5 ml de TFA. Se agitó el medio de reacción durante 30 h a temperatura ambiente en atmósfera de aire. Se desechó la fase acuosa y a la orgánica se le adicionó 10 mL de TEA. Luego, se realizaron dos extracciones de 8 ml cada una con agua ultrapura. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y el solvente se removió bajo presión reducida seguida de vacío en desecador y se obtuvo el producto de interés con un rendimiento del 97%. ^1H NMR (CDCl_3 , TMS) δ [ppm]: -2,81 (2H, pirrol NH); 2,02 (m, 6H); 2,48 (s, 18H, N- CH_3); 2,50 (t, 6H, $J=7,1$ Hz); 3,98 (t, 6H, $J=6,0$ Hz); 6,97 (d, 6H, $J=8,6$ Hz, 5,10,20-Ar 3,5-H); 7,93 (d, 6H, $J=8,6$ Hz, 5,10,20-Ar 2,6-H); 7,82 (d, 2H, $J=8,4$ Hz, 20-Ar 2,6-H); 8,18 (d, 2H, $J=8,4$ Hz, 20-Ar 3,5-H); 8,80-8,87 (m, 8H, pirrol), 10,34 (s, 1H, Ar-CHO). ESI-MS [m/z] 946,4991 [$M+H$] $^+$ (946,2090 calculado para $\text{C}_{60}\text{H}_{63}\text{N}_7\text{O}_4$).

3.5.13. Díada TAP-C₆₀

La unión covalente de la porfirina P4 con el fullereno C₆₀ se llevó a cabo mediante una cicloadición 1,3-dipolar en 150 ml de tolueno/DMF (5:1) a partir de P4 (100 mg, 0,11 mmol), *N*-metilglicina (10 mg, 0,12 mmol) y fullereno C₆₀ (76 mg, 0,11 mmol). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 72 h en atmósfera de argón. El producto de interés, se purificó mediante extracciones sucesivas. Primero se realizaron extracciones con tolueno hasta la completa desaparición del C₆₀ y de sus derivados. Luego, se empleó THF para extraer totalmente la porfirina que no reaccionó. Ambas purificaciones se siguieron mediante espectroscopia UV-visible. Este procedimiento permitió obtener una díada porfirina-fullereno C₆₀ con un rendimiento del 20%. TLC (tolueno/10% Acetato de etilo/1% TEA) R_f = 0,61. FT-IR (KBr) ν [cm⁻¹]: 2957, 2920, 2851, 1736, 1647, 1493, 1466, 1184, 1082, 970, 893, 804, 723, 575, 526. ESI-MS [m/z] 1693,9390 [M+H]⁺ (1692,5414 calculado para C₁₂₂H₆₈N₈O₃).

3.5.14. Díada TAP-C₆₀⁴⁺

Con el fin de obtener una díada catiónica, los grupos aminos presentes en la díada TAP-C₆₀ se metilaron empleando un exceso de sulfato de dimetilo. La reacción se llevó a cabo usando como solvente el reactivo metilante (2 ml, 21,10 mmol) y agitando a 90 °C durante 44 h en atmósfera de aire. Posteriormente, se precipitó el producto de interés con éter etílico y se lo lavó con una solución de Na₂CO₃ al 5% y con agua ultrapura. Finalmente, se secó el producto bajo presión reducida y se obtuvo un sólido marrón con un rendimiento del 96%. ESI-MS [m/z] 1754,0768 [M+2H]⁺ (1752,6331 calculado para C₁₂₆H₈₀N₈O₃).

3.5.15. 5,10,15,20-Tetrakis[3-(*N*-etilcarbazoil)]porfirina (TCP)

La condensación de DPM1 con 4-(4,4-dimetil-2,6-dioxan-1-il)benzaldehído y *N*-etil-3-carbazolcarbaldehído (Sección 3.4.3), formó como producto secundario la 5,10,15,20-tetrakis[3-(*N*-etilcarbazoil)]porfirina (TCP). Esta, se purificó por cromatografía en columna *flash* obteniéndose con un 12% (84 mg) de rendimiento. TLC (cloroformo) R_f = 0,58. Los estudios espectroscópicos que confirman su estructura están de acuerdo con resultados reportados con anterioridad.^{162, 382}

3.5.16. Zn(II) 5,10,15,20-Tetrakis[3-(*N*-etilcarbazoil)]porfirina (ZnTCP)

La porfirina ZnTCP se sintetizó disolviendo la porfirina TCP (21 mg, 0,019 mmol) en 7 ml de diclorometano. Luego, se agregó 2 ml de una solución saturada de acetato de zinc (II) en metanol. La mezcla se agitó durante 1 h en atmósfera de argón a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se siguió por espectroscopia de absorción UV-visible dado que a medida que disminuye la concentración de la porfirina base libre desaparecen 2 de las 4 bandas Q. Una vez finalizada la misma, se llevaron a cabo 3 extracciones con 15 ml de agua. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y el solvente se eliminó bajo presión reducida obteniéndose 21 mg (95%) de ZnTCP puro. ¹H RMN (CDCl₃, TMS) δ [ppm]: 1,68 (t, 12H, J=7,1 Hz, carbazol-CH₃); 4,63 (q, 8H, J=7,1 Hz carbazol-CH₂); 7,29 (m, 4H, Ar carbazol); 7,58 (m, 8H, Ar carbazol); 7,74 (d, 4H, Ar carbazol, J = 8,5 Hz); 8,16 (d, 4H, Ar carbazol, J = 8,0 Hz); 8,38 (d, 4H, Ar carbazol, J = 8,4 Hz); 8,94-9,01 (m, 12H, pirrol y Ar carbazol). APPI-MS [m/z]=1145.3998 [M+H]⁺ (1144,3919 calculado para C₇₆H₅₆N₈Zn).

3.6. Experimentos electroquímicos

Los estudios electroquímicos se realizaron en una celda con tres electrodos a temperatura ambiente como se muestra en Figura N°15. Se emplearon soluciones de TCP, ZnTCP, PCBZTPA, ZnPCBZTPA, ZnTCP-C₆₀ y TCP-C₆₀ en 1,2-dicloroetano (DCE) y *o*-diclorobenceno (*o*-DCB) que contienen perclorato de tetra-*N*-butilamonio (TBAP) como electrólito soporte (0,1 M). La voltametría cíclica (VC) se llevó a cabo con un potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT30 (Eco Chemie BV, Utrecht, Países Bajos).

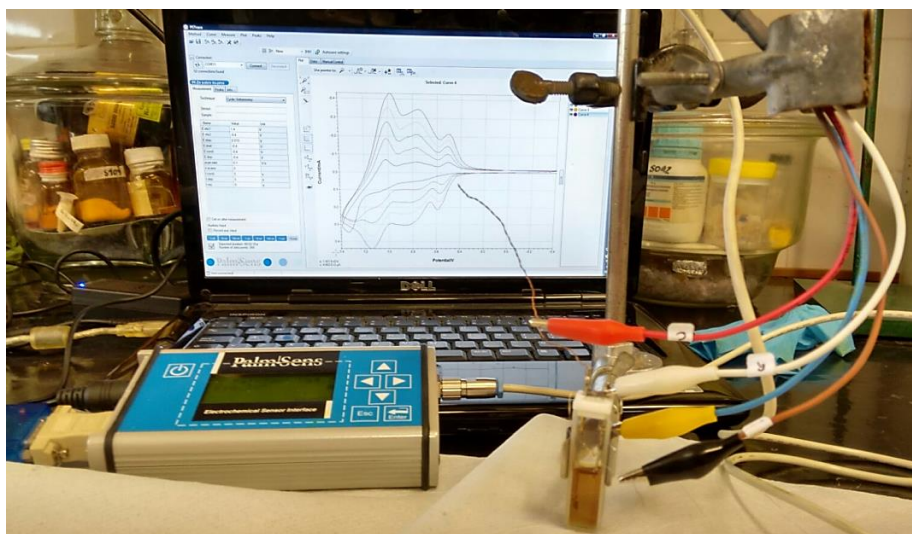


Figura N°15. Celda de tres electrodos y potenciostato/galvanostato PalmSens, empleados para los experimentos electroquímicos de obtención de superficies.

El sistema de medida consiste en un disco de Pt, una lámina de Pt y un alambre de plata como electrodos de trabajo, contraelectrodo y de *pseudo* referencia, respectivamente. Además, se emplearon electrodos transparentes de óxido de indio y estaño (ITO) (7x50x0,9 mm, Delta Technologies, Stillwater, MN) como electrodos de trabajo para la formación de películas individuales y dobles capas con actividad antimicrobiana. En todos los casos, las VC se llevaron a cabo con una velocidad de barrido de 100 mV/s. El número de ciclos para cada voltametría fue el necesario para obtener la absorbancia deseada en la banda *Soret* de cada superficie.

3.7. Preparación de soluciones *stock* de los fotosensibilizadores

Para los estudios espectroscópicos, fotoquímicos y fotodinámicos, se prepararon *stocks* de los fotosensibilizadores tanto en tolueno como en DMF de concentraciones entre 0,1 – 0,5 mM. Para tal fin, se disolvió cada una de las moléculas en el correspondiente solvente, y posteriormente se determinó la concentración del *stock* por espectroscopía de absorción UV-visible a partir de los correspondientes coeficientes de extinción molar (ϵ). Para los estudios microbiológicos se emplearon las soluciones de las moléculas preparadas en DMF.

3.8. Estudios espectroscópicos

Los espectros de absorción y de fluorescencia se llevaron a cabo en DMF, tolueno y agua, y además en un medio micelar de tolueno/AOT (0,1 M)/agua ($W_0=10$) (la descripción de su preparación se detalla en la sección 3.9.1.). Las absorbancias a la longitud de onda de excitación ($\lambda=550$ nm) fue en todos los casos $<0,05$ y las áreas de los espectros de emisión se integraron en el intervalo de 600-800 nm. La energía del estado singlete (E_s) se calculó a partir de la intersección de las curvas de absorción y de fluorescencia normalizada.

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) se calcularon por comparación del área bajo el espectro de emisión corregido de cada fotosensibilizador con respecto al área de la porfirina referencia TMP (Ecuación N°1).³⁸³⁻³⁸⁴ Los valores de Φ_F para TMP en DMF ($\Phi_F^{DMF}=0,14$) y en tolueno ($\Phi_F^{tolueno}=0,12$) se calcularon por comparación con el espectro de fluorescencia en THF usando $\Phi_F=0,14$.²⁴³ Además, se tuvo en cuenta el índice de refracción del tolueno, la DMF y el THF.

$$\Phi_F^{FS} = \frac{A^R}{A^{FS}} \frac{I^{FS}}{I^R} \left(\frac{\eta_2}{\eta_1} \right)^2 \Phi_F^R \quad (1)$$

donde A corresponde a la absorbancia medida a la longitud de onda de excitación, I es el área debajo del espectro de emisión, η son los índices de refracción de los dos solventes empleados ($\eta_{\text{tolueno}} = 1,496$ y $\eta_{\text{DMF}} = 1.496$ a 20°C), FS es el fotosensibilizador en estudio y R el compuesto elegido como referencia. Las áreas se determinaron utilizando un programa de cálculo (Microcal Origin, Northampton, MA) a partir de los gráficos de intensidad de fluorescencia vs frecuencia.

3.9. Estudios en medios homogéneos. Fotólisis en estado estacionario

3.9.1. Reducción de metil viológeno por TCP-C₆₀ y TCP-C₆₀⁴⁺

Soluciones de la diádas (TCP-C₆₀ o TCP-C₆₀⁴⁺, 3,0x10⁻⁶ M), MV²⁺ (8,0x10⁻⁴ M) y TMN (4,0x10⁻⁴ M) o NADH (4,0x10⁻⁴ M) preapradas en DMF con un 5% de H₂O, se irradiaron con luz monocromática de $\lambda = 433 \pm 5$ nm en atmósfera de argón. La reacción fotoquímica se siguió monitoreando el incremento de los espectros de absorción a $\lambda = 398$ nm y $\lambda = 607$ nm durante diferentes tiempos de iluminación.

3.9.2. Fotooxidación de 9,10-dimetilantraceno

Soluciones de 9,10-dimetilantraceno (DMA, 35 μ M) y el fotosensibilizador se irradiaron con luz monocromática en el máximo de la banda *Soret* (Absorbancia $\sim 0,1$) de cada molécula, en 2 ml de DMF o de tolueno. Las cinéticas de fotooxidación de DMA se estudiaron siguiendo la disminución de la absorbancia a $\lambda_{\text{max}} = 379$ nm. En estas condiciones experimentales, la concentración de O₂(¹ Δ_g) se mantiene prácticamente constante dado que la reposición de oxígeno es más rápida que la reacción de fotooxidación.³⁸⁵

Las constantes de velocidad observadas (k_{obs}) se obtuvieron luego de ajustar linealmente un gráfico de $\ln(A_0/A)$ vs tiempo de irradiación (s). Para la reacción de DMA con O₂(¹ Δ_g) en estado estacionario (Ecuación N°2), la velocidad de desaparición del sustrato es expresada mediante la Ecuación N°3:



$$\frac{\delta[\text{DMA}]}{\delta t} = -k_r[\text{DMA}][\text{O}_2(^1\Delta_g)] = -k_{\text{obs}}[\text{DMA}] \quad (3)$$

Integrando (3), se obtiene:

$$\text{Ln} \frac{[\text{DMA}]_0}{[\text{DMA}]_t} = k_{obs} t \quad (4)$$

Donde $[\text{DMA}]_0$ y $[\text{DMA}]_t$ representan las concentraciones de DMA a tiempo de reacción cero y a un determinado tiempo de reacción t . Reemplazando estas concentraciones de DMA por las correspondientes absorbancias a una longitud de onda de 379 nm se obtiene:

$$\text{Ln} \frac{A_0}{A_t} = k_{obs} t \quad (5)$$

El avance de la reacción puede graficarse en forma lineal, de modo tal que el término de la izquierda es la variable dependiente, el tiempo (t) la variable independiente y el valor de k_{obs} se obtiene de la pendiente del gráfico.

Los valores de rendimiento cuántico de producción de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (Φ_Δ) para cada fotosensibilizador, se calcularon por comparación directa de las pendientes en la región lineal del gráfico entre una referencia (TMP, $\Phi_\Delta^{\text{DMF}}=0,65$ y $\Phi_\Delta^{\text{tolueno}}=0,67$)²⁴³ y el fotosensibilizador, para una misma absorbancia de los dos compuestos (R y FS) a la λ_{irr} . Esto es:

$$\Phi_\Delta^{\text{FS}} = \frac{\Phi_\Delta^{\text{R}} k_{obs}^{\text{FS}}}{k_{obs}^{\text{FS}}} \quad (6)$$

3.9.3. Reacción de los fotosensibilizadores con azul de nitrotetrazolio

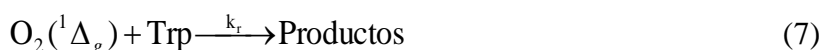
Soluciones de azul de nitrotetrazolio (NBT, 0,2 mM), nicotinamida adenina dinucleótido (NADH, 0,5 mM) y los fotosensibilizadores TCP, TCP-C₆₀ o TCP-C₆₀⁴⁺, se irradiaron con luz monocromática $\lambda_{irr}=428\pm 5$ nm (absorbancia del fotosensibilizador 0,3 en la banda *Soret*) en 2 ml de DMF con un 1% de H₂O. Las cinéticas de fotooxidación de NBT se estudiaron siguiendo la aparición del producto diformazán (DF) que absorbe a $\lambda_{m\acute{a}x}=560$ nm. Experimentos control se realizaron con el fotosensibilizador junto con NBT o NADH y, en ausencia del fotosensibilizador sólo con los sustratos.

3.9.4. Fotooxidación de L-triptófano

Soluciones en DMF del aminoácido L-triptófano (Trp) (15-30 μM) y los fotosensibilizadores TCP, TCP-C₆₀, TCP-C₆₀⁴⁺, TAP-C₆₀ o TAP-C₆₀⁴⁺, se irradiaron con luz monocromática $\lambda_{irr}=428\pm 5$ nm (absorbancia del fotosensibilizador 0,1 en la banda *Soret*). Las cinéticas de fotooxidación del sustrato se estudiaron siguiendo la disminución de la

fluorescencia a $\lambda_{\text{máx}}=340$ nm. Los espectros de fluorescencia de cada muestra en presencia del aminoácido se obtuvieron excitando las mismas a $\lambda_{\text{exc}}=290$ nm. En estas condiciones, la absorbancia de Trp a 290 nm es $\sim 0,1$ y la [Trp] es proporcional a la intensidad de fluorescencia. Por lo tanto, las constantes de velocidad observadas (k_{obs}) se obtuvieron luego de ajustar linealmente un gráfico de $\text{Ln}(I_0/I)$ vs tiempo de irradiación (s).

Para la reacción de Trp con $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ en estado estacionario (Ecuación N°7), la velocidad de desaparición del sustrato es expresada mediante la Ecuación N°8:



$$\frac{d[\text{Trp}]}{dt} = -k_r [\text{O}_2(^1\Delta_g)] [\text{Trp}] = -k_{\text{obs}} [\text{Trp}] \quad (8)$$

Integrando (8) se obtiene

$$\text{Ln} \frac{[\text{Trp}]_0}{[\text{Trp}]_t} = k_{\text{obs}} t \quad (9)$$

Donde $[\text{Trp}]_0$ y $[\text{Trp}]_t$ representan las concentraciones de Trp a tiempo de reacción cero y a un determinado tiempo de reacción t. Reemplazando estas concentraciones de Trp por las correspondientes intensidades de fluorescencia a una longitud de onda de 340 nm se obtiene:

$$\text{Ln} \frac{I_0}{I_t} = k_{\text{obs}} t \quad (10)$$

El avance de la reacción puede graficarse en forma lineal, de modo tal que el término de la izquierda es la variable dependiente, el tiempo (t) la variable independiente y el valor de k_{obs} se obtiene de la pendiente del gráfico.

Con el objetivo de determinar el mecanismo a través del cual los fotosensibilizadores producen la acción fotodinámica, se adicionó al medio de reacción distintos atrapadores de diferentes ROS. A soluciones de Trp (15-30 μM) y el fotosensibilizador disueltos en 2 ml de DMF se les adicionó β -caroteno (5,6 μM) a partir de un stock (4,2 mM) preparado en DMF, azida (50 mM) y D-manitol (50 mM) a partir de stocks preparados en H_2O , de concentraciones 2 M y 1 M, respectivamente. Posteriormente, se irradiaron las soluciones con luz monocromática $\lambda_{\text{irr}}=562\pm 5$ nm (absorbancia del fotosensibilizador 0,1 en la banda *Soret*).

3.10. Estudios en medios microheterogéneos

3.10.1. Estudios en micelas inversas de AOT

Se preparó una solución stock 0,1 M de AOT por pesada y posterior dilución con tolueno destilado. La adición de agua a la solución se realizó empleando una microjeringa previamente calibrada. La cantidad de agua presente en el sistema se expresó como la relación molar entre la concentración de agua y de AOT presentes en la micela inversa ($W_0=[H_2O]/[AOT]$). En todos los experimentos se utilizó un valor de $W_0=10$ y las mezclas se sometieron a ultrasonido durante aproximadamente 10 s para obtener soluciones micelares transparentes.³⁸⁶⁻³⁸⁷

El modelo de dos *pseudo* fases se utilizó para evaluar la distribución del fotosensibilizador entre las micelas inversas de AOT y el tolueno.³⁸⁸ La constante de distribución se expresa de la siguiente manera:

$$K_{AOT} = \frac{[FS]_u}{[FS]_l[AOT]} \quad (11)$$

donde [AOT] es la concentración de surfactante y los términos $[FS]_u$ y $[FS]_l$ se refieren a la concentración del fotosensibilizador unido y libre, respectivamente. Los valores de K_{AOT} , se determinaron a partir de los cambios en la emisión de fluorescencia de la banda $Q_x(0-0)$ con respecto a la variación de la concentración de AOT. Luego, los datos experimentales de I y Φ_F , se ajustaron de manera no lineal utilizando la Ecuación N°12,³⁸⁹

$$I^\lambda = \frac{[FS]_0 (\Phi_{Fl} + \Phi_{Fu} K_{AOT} [AOT])}{(1 + K_{AOT} [AOT])} \quad (12)$$

donde I^λ es la intensidad de emisión a diferentes [AOT], $[FS]_0$ es la concentración inicial del fotosensibilizador, Φ_{Fl} y Φ_{Fu} son los rendimientos cuánticos de fluorescencia para el fotosensibilizador libre en tolueno y unido a las micelas, respectivamente. Esta ecuación se aplica a un valor fijo de W_0 cuando $[FS]_0 \ll [AOT]$.³⁸⁸

La descomposición fotosensibilizada de DMA se realizó en micelas inversas como se explicó anteriormente en la Sección 3.7.1. Los valores de Φ_Δ se calcularon utilizando TCP ($\Phi_\Delta^{\text{tolueno}}=0,42\pm0,02$) como referencia debido a que esta porfirina está disuelta principalmente en el solvente externo (tolueno).

3.11. Estudios con películas poliméricas. Fotólisis en estado estacionario

3.11.1. Fotooxidación de 2,2'-(antraceno-9,10-diil)bis(metilmalonato) de sodio

Soluciones de 2,2'-(antraceno-9,10-diil)bis(metilmalonato) de sodio (ABMM, 35 μ M) y las película de polímeros electrogeneradas sobre ITO o la porfirina TPPS⁴⁻, se irradiaron empleando un filtro óptico para seleccionar un rango de longitudes de onda entre 455-800 nm (absorbancia de la superficie 0,1 en la banda *Soret*) en 2 ml de agua.

La cinética de fotooxidación de ABMM se estudió siguiendo la disminución de la absorbancia a $\lambda_{\text{max}}=379$ nm. En estas condiciones experimentales, la reacción sigue una cinética de *pseudo* primer orden al igual que el DMA. Las constantes de velocidad observadas (k_{obs}) se obtuvieron luego de ajustar linealmente un gráfico de $\ln(A_0/A)$ vs tiempo de irradiación (s). La capacidad de las películas poliméricas de generar O₂(¹ Δ_g) relativo a TPPS⁴⁻, la cual presenta un $\Phi_{\Delta}=0,74$ en agua²⁵² se determinó mediante la siguiente relación:

$$\frac{k_{\text{obs}}^{H_2O}(\text{polímero})}{k_{\text{obs}}^{H_2O}(\text{TPPS}^{4-})} \quad (13)$$

3.11.2. Reacción de los polímeros antibacterianos con azul de nitrotetrazolio

Soluciones de azul de nitrotetrazolio (NBT, 0,2 mM), nicotinamida adenina dinucleótido (NADH, 0,5 mM) y las películas poliméricas o la porfirina TPPS⁴⁻, se irradiaron empleando un filtro óptico para seleccionar un rango de longitudes de onda entre 455-800 nm (absorbancia de la superficie 0,1 en la banda *Soret*) en 2 ml de agua. Las cinéticas de fotooxidación de NBT en condiciones aeróbicas, se estudiaron siguiendo la aparición del producto DF que absorbe a $\lambda_{\text{max}}=600$ nm. Experimentos control se realizaron en ausencia de NBT, NADH o el fotosensibilizador.

3.11.3. Fotooxidación de L-triptófano

Soluciones del aminoácido Trp (25 μ M) y las películas poliméricas o la porfirina TPPS⁴⁻, se irradiaron empleando un filtro óptico para seleccionar un rango de longitudes de onda entre 455-800 nm (absorbancia de la superficie 0,1 en la banda *Soret*) en 2 ml de agua. Las cinéticas de fotooxidación del sustrato se estudiaron siguiendo la disminución de la fluorescencia a $\lambda_{\text{máx}}=352$ nm. Los espectros de emisión de cada muestra en presencia del aminoácido, se obtuvieron excitando las mismas a $\lambda_{\text{exc}}=290$ nm. En estas condiciones, la absorbancia de Trp a 290 nm es $\sim 0,1$ y la [Trp] es proporcional a la intensidad de

fluorescencia. Las constantes de velocidad observadas (k_{obs}) se obtuvieron luego de ajustar linealmente un gráfico de $\ln(I_0/I)$ vs tiempo de irradiación (s) dado que la reacción sigue una cinética de *pseudo* primer orden (cuya demostración se describe en la sección 3.8.3.). La capacidad de las superficies poliméricas de fotooxidar el aminoácido Trp se determinó con la Ecuación N°13.

3.12. Estudios con microorganismos

Uno de los microorganismos utilizado en este estudio fue la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 25923. Esta bacteria se cultivó en un agitador rotatorio (100 rpm) a 37 °C en caldo Tripticasa Soya (CTS, Britania, Buenos Aires, Argentina) durante 24 h. Alícuotas (60 μ l) de este cultivo se transfirieron asépticamente a 4 ml de medio fresco y se incubaron con agitación a 37 °C hasta llegar a la mitad de la fase logarítmica cuya absorbancia es de $\sim 0,3$ a $\lambda=660$ nm (Figura N°16A). Las células se centrifugaron (3000 rpm durante 15 min) y se volvieron a suspender en una cantidad igual de buffer fosfato salino 10 mM (PBS, pH=7,0) (1,5 mM KH_2PO_4 y 8,0 mM Na_2HPO_4). A continuación, se diluyeron las células 1/1000 en PBS, lo que corresponde a $\sim 10^6$ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml o se suspendieron en PBS sin diluir lo que corresponde a $\sim 10^8$ UFC/ml. Ambas densidades celulares se prepararon para estudios de PDI empleando los fotosensibilizadores disueltos en solución. Por otro lado, las bacterias se diluyeron en 1/100000 en PBS, lo que corresponde a $\sim 10^4$ UFC/ml para estudios de PDI empleando superficies poliméricas.

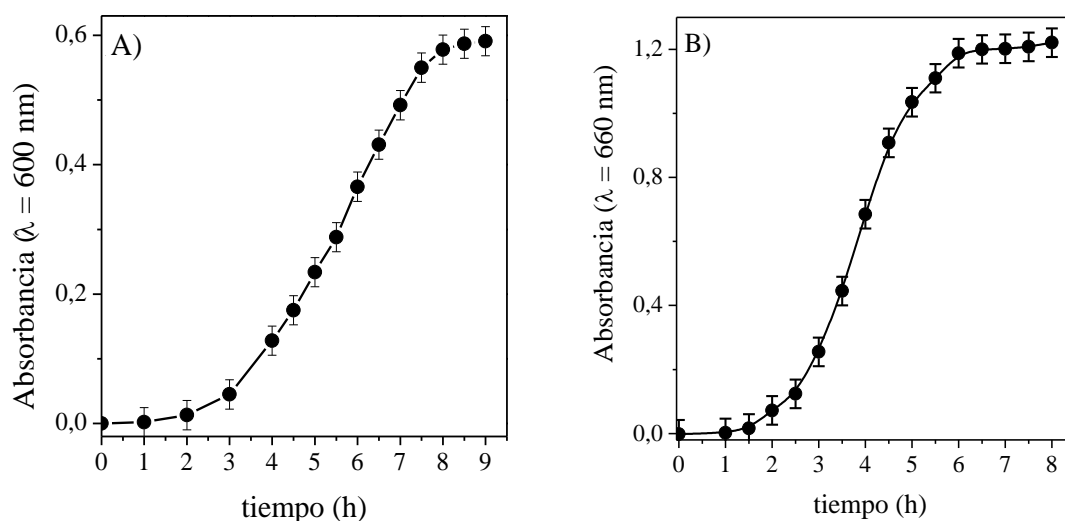


Figura N°16. Curvas de crecimiento en CTS a 37°C de (A) *S. aureus* y (B) *E. coli*.

Por otro lado, se realizaron estudios con la bacteria *E. coli* EC7. Este microorganismo se aisló de una muestra de material urogenital clínico y se identificó por el método tradicional¹⁷¹ y por el test mini API ID 32E (BioMérieux), un sistema estandarizado para la identificación de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram negativos no exigentes.³⁹⁰ Para los ensayos realizados *in vitro*, la cepa de *E. coli* se cultivó aeróbicamente a 37 °C en CTS durante toda la noche. En este caso, alícuotas (40 µl) de este cultivo se transfirieron asépticamente a 4 ml de medio fresco y se incubaron a 37 °C hasta la mitad de la fase logarítmica cuya absorbancia es 0,6 a $\lambda=660$ nm (Figura N°16B). Las células en la fase logarítmica de crecimiento se recogieron por centrifugación de los caldos de cultivo (3000 rpm durante 15 min) y se volvieron a suspender en 4 ml de PBS. A continuación, se diluyeron las células 1/1000 en PBS, lo que corresponde a $\sim 10^6$ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml o se suspendieron en PBS sin diluir lo que corresponde a $\sim 10^8$ UFC/ml. Ambas densidades celulares se prepararon para estudios de PDI empleando los fotosensibilizadores disueltos en solución. Por otro lado, las bacterias se diluyeron en 1/100000 en PBS, lo que corresponde a $\sim 10^4$ UFC/ml para estudios de PDI empleando superficies poliméricas.

Los experimentos llevados a cabo tanto con *S. aureus* y *E. coli* se realizaron empleando dos metodologías diferentes. Por un lado se utilizaron 2 ml de las suspensiones de células en tubos de cultivo de la marca Pyrex (13x100 mm). Por otro lado, los ensayos se llevaron a cabo transfiriendo 200 µl de suspensión celular a placas de 96 pocillos. Las suspensiones de las bacterias antes mencionadas se diluyeron en serie con PBS y cada dilución se sembró mediante dos técnicas distintas: la técnica de extensión en placa por triplicado o mediante la siembra de la microgota (20 µl) por sextuplicado.³⁹¹ Se monitorearon las bacterias viables y el número de UFC/ml se determinó en placas de ágar Tripticasa Soya (ATS) después de ~ 24 h de incubación a 37°C.

Los medios de cultivo y materiales de laboratorio se esterilizaron en autoclave (All America, Model 25x-2, Manitowoc, USA) a 20 psi ~ 115 - 121°C durante 20 min. Los medios agarizados se colocaron en placas de Petri estériles descartables de 10 cm de diámetro.

3.13. PDI de *S. aureus* y *E. coli* con fotosensibilizadores disueltos en solución

3.13.1. Inactivación fotodinámica de *S. aureus* y *E. coli*. Metodología I

Suspensiones celulares de *S. aureus* (2 ml, $\sim 10^6$ UFC/ml) en PBS se incubaron en tubos de ensayos de vidrio con los fotosensibilizadores TCP, TCP⁴⁺, MPC₆₀, DAC₆₀⁺, TCP-

C₆₀ y TCP-C₆₀⁴⁺ (1 y 5 µM) durante 30 min en la oscuridad a 37°C y con agitación constante (100 rpm). Luego, los cultivos se expusieron durante diferentes intervalos de tiempo (5, 15 y 30 min) a la luz visible. Por otro lado, los estudios con la bacteria *E. coli* (2 ml, ~10⁶ UFC/ml en PBS) se llevaron a cabo con la díada TCP-C₆₀⁴⁺ en concentración 5 µM. El cultivo se incubó con la molécula durante 30 min en la oscuridad a 37°C y luego se irradió durante 30 min con luz visible. Todas las suspensiones celulares (control de irradiación, oscuridad y las tratadas) se diluyeron en forma consecutiva con PBS. Cada dilución se sembró por triplicado en placas de ATS.

3.13.2. Inactivación fotodinámica de *S. aureus* y *E. coli*. Metodología II

Suspensiones celulares (1 ml, ~10⁸ UFC/ml) en PBS se incubaron con las díadas TMP-C₆₀, TCP-C₆₀, TAP-C₆₀, TCP-C₆₀⁴⁺ y TAP-C₆₀⁴⁺ (1 y 5 µM) durante 30 min en la oscuridad a 37°C y con agitación constante (100 rpm). Alícuotas de 200 µl se transfirieron a una placa de 96 pocillos. Luego, los cultivos se expusieron durante diferentes intervalos de tiempo (5, 15 y 30 min) a la luz visible. Todas las suspensiones celulares (control de irradiación, oscuridad y las tratadas) se diluyeron en forma seriada con PBS. Cada dilución se sembró con la técnica de la microgota (20 µl) en placas de ATS por sextuplicado.

3.14. Inactivación de *S. aureus* y *E. coli* empleando superficies electropolimerizadas

3.14.1. Inactivación de *S. aureus*. Metodología I

Suspensiones celulares de esta bacteria Gram positiva en PBS se inactivaron empleando las superficies obtenidas mediante voltametría cíclica (Área=0,7x3,0=2,1 cm²). Con tal fin, se colocaron dentro de una placa de Petri estéril y se depositó sobre cada superficie una gota (250 µl) de PBS con *S. aureus* (~10⁴ UFC/ml). Posteriormente, se expusieron a la luz visible durante diferentes intervalos de tiempo (15, 30 y 60 min). A partir de las suspensiones celulares (control de irradiación, oscuridad y las tratadas) se prepararon diluciones seriadas en PBS. Cada dilución se sembró por triplicado en placas de ATS.

3.14.2. Inactivación de *S. aureus* y *E. coli*. Metodología II

Suspensiones celulares de estos microorganismos (150 µl, ~10⁴ UFC/ml) en PBS se transfirieron a una placa de 96 pocillos. En cada pocillo se colocó 2 porciones aproximadamente cuadradas de los polímeros electroquímicos (Área=0,3x0,3=0,09 cm²). Posteriormente, las soluciones con las superficies, se expusieron a la luz visible durante

diferentes intervalos de tiempo (10, 20 y 30 min). Las suspensiones celulares (control de irradiación, oscuridad y las tratadas) se utilizaron para obtener diluciones seriadas en PBS. Cada dilución se sembró por triplicado en placas de ATS.

3.14.3. PDI de biopelículas de *S. aureus* creciendo sobre superficies electropolimerizadas

Se formó una biopelícula con la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 25923. Esta bacteria se cultivó en un agitador rotatorio (100 rpm) a 37 °C en CTS durante 24 h. Alícuotas (60 µl) de este cultivo se transfirieron asépticamente a 4 ml de medio fresco y se incubaron con agitación a 37 °C hasta llegar a la mitad de la fase logarítmica (densidad óptica de ~0,5 a $\lambda=660$ nm).

El ensayo se llevó a cabo en una placa con 24 pocillos. A cada pocillo se le agregó electrodos transparentes de óxido de indio dopado con estaño (ITO) y las superficies electropolimerizadas con el fotosensibilizador de 0,5 cm x 0,8 cm de área. Luego, se transfirió a cada pocillo 100 µl de CTS con microorganismos, 1 ml de medio fresco y 0,9 ml de PBS (pH=7,0). El medio de cultivo posee un 1,1% de glucosa. Para que la bacteria crezca en forma de biopelícula sobre las superficies, se cultivó la placa en agitador rotatorio (100 rpm) a 37 °C durante 24 h. Cada superficie se lavó dos veces con PBS y se limpió el lado no electropolimerizado con hisopo estéril. Después, las superficies se expusieron a la luz visible durante diferentes intervalos de tiempo (30 y 60 min). Para determinar las UFC, las superficies se sonicaron en un tubo de ensayo con 1 ml de PBS durante 1 min. Esta metodología está basada en el desarrollo experimental llevado a cabo por Mamone y col.³⁹² Finalmente, se realizaron las diluciones en serie correspondientes. Para la siembra se empleó la técnica de la microgota (20 µl) por sextuplicado.

3.15. Mecanismo de acción fotodinámica *in vitro*

Suspensiones celulares de *S. aureus* (2 ml, $\sim 10^6$ UFC/ml - 1 ml, $\sim 10^6$ UFC/ml y $\sim 10^8$ UFC/ml) en PBS se trataron de diferentes maneras. Estudios en condiciones anóxicas, se llevaron a cabo mediante el desplazamiento del oxígeno con argón durante 15 min antes de la irradiación, y se mantuvo tal atmósfera durante el tiempo de iluminación. Por otro lado, suspensiones bacterianas en PBS se estudiaron en presencia de azida y D-manitol. Estos compuestos se agregaron al medio a partir de soluciones *stocks* preparados en agua, de concentración 1 M. Los microorganismos en las condiciones antes descriptas, se incubaron

en agitación durante 30 min a 37 °C en la oscuridad con 1 µM de TCP-C₆₀ y TCP-C₆₀⁴⁺, 1 µM de TAP-C₆₀ y 0,5 µM de TAP-C₆₀⁴⁺. Luego, los cultivos se irradiaron con luz visible durante 5 min para TAP-C₆₀⁴⁺ y por 15 min para el resto de las moléculas. Para los ensayos de fotoinactivación en D₂O, las células se centrifugaron (3000 rpm durante 15 min), se re-suspendieron en 2 ml de PBS en D₂O y se incubaron 30 min con el nuevo medio para permitirle a la bacteria adaptarse al mismo. A continuación, la suspensión se incubó con la cantidad correspondiente de los fotosensibilizadores como se describió anteriormente.

En todos los casos, suspensiones celulares de control irradiado y oscuridad y las tratadas, se diluyeron en forma seriada con PBS. Cada dilución de TCP-C₆₀ Y TCP-C₆₀⁴⁺ se sembraron por triplicado en placas de ATS y las de TAP-C₆₀ y TAP-C₆₀⁴⁺ se sembraron en placas de ATS con la técnica de la microgota (20 µl) por sextuplicado.

3.16. Cálculo de porcentajes de inactivación de microorganismos

Para determinar el porcentaje de células que murieron debido a la acción de la PDI se lleva a cabo el siguiente cálculo matemático el cual se va a explicar mediante un ejemplo. Considerando que la cantidad de células iniciales es de 4 log (equivalente 10000 UFC/ml) y que la disminución en la viabilidad celular fue de 3,5 log, se tiene que la cantidad de células vivas luego del tratamiento fue de 0,5 log (equivalente a 3 UFC/ml). Por lo tanto, el porcentaje de inactivación se calcula de la siguiente manera:

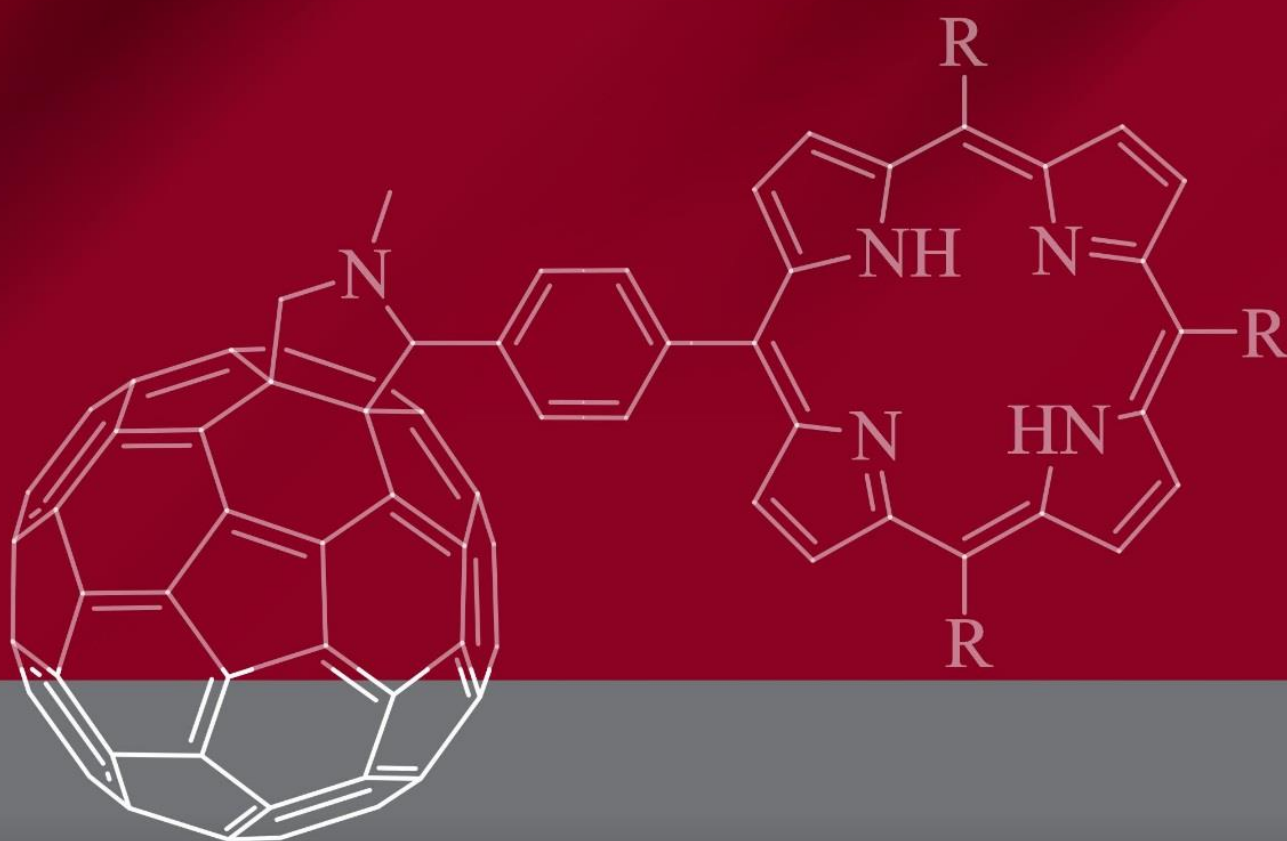
$$100\% - \frac{3 \frac{UFC}{ml} \times 100\%}{10000 \frac{UFC}{ml}} = 99,97\% \quad (14)$$

Así, en este ejemplo el porcentaje de inactivación fue del 99,97%.

3.17. Experimentos control y análisis estadísticos

Los experimentos de control se realizaron en presencia y ausencia de los fotosensibilizadores y de las superficies poliméricas en la oscuridad, y en la ausencia de estos con células irradiadas. La cantidad de DMF utilizada en cada experimento (<2,5% v/v) no resultó tóxica para las células de *S. aureus* ni para las de *E. coli*. Entre tres y seis valores se obtuvieron por cada condición en función de la metodología empleada, y cada experimento se repitió tres veces por separado. Se utilizó la prueba *t* no pareada para establecer la importancia de las diferencias entre los grupos. Tales diferencias se consideraron

estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$). Los datos se representan como la media \pm desviación estándar de cada grupo.

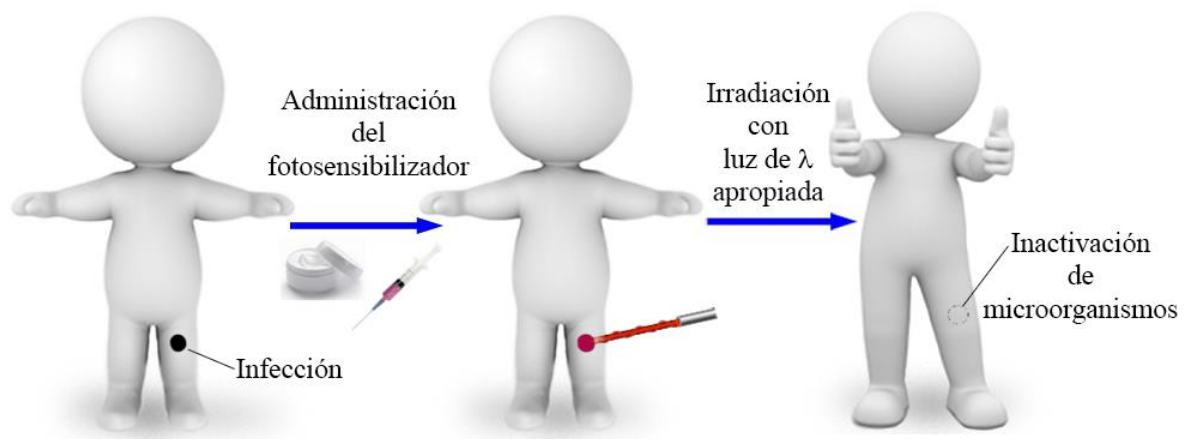


CAPÍTULO IV

Resultados y Discusión

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fotosensibilizadores para el tratamiento de infecciones



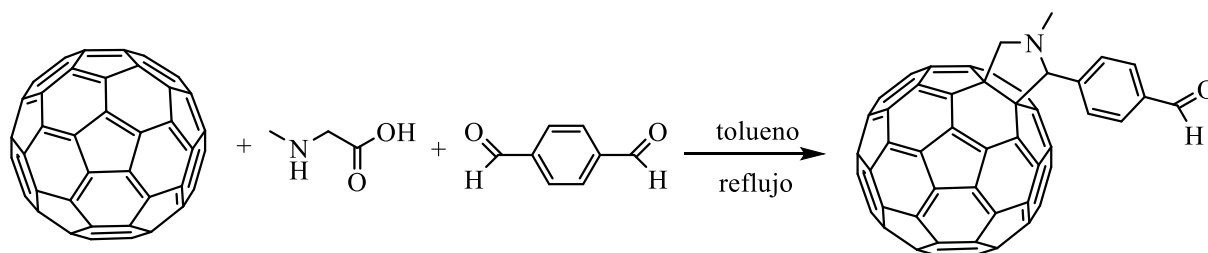
CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las porfirinas y los fullerenos C_{60} poseen ciertas propiedades que los convierten en muy buenos fotosensibilizadores. Estas moléculas generan ROS eficientemente y son capaces de interaccionar con las células microbianas produciendo su muerte. Sin embargo, tienen ciertas desventajas. Los fullerenos no son solubles en agua y presentan bajas absorciones en la región visible del espectro. Las porfirinas son fotosensibles y se agregan con facilidad en medios biológicos. Teniendo en cuenta estas características moleculares, se diseñó una díada porfirina-fullereno C_{60} , en la que ambos monómeros están unidos covalentemente. Cuando este fotosensibilizador es irradiado con luz visible, la porfirina actúa como una antena captadora de energía que la transfiere al fullereno C_{60} . Así, esta nueva molécula absorbe luz en toda la región visible del espectro y ambos cromóforos pueden producir ROS de manera efectiva. Además, la díada puede formar un estado de separación de carga fotoinducido, lo que da lugar a un proceso fotoquímico adicional capaz de producir ROS mediante un mecanismo de acción fotodinámico tipo I. También, la díada es una molécula anfifílica con mayor capacidad de interaccionar con las membranas bacterianas, por lo que cuando genere ROS al ser iluminada, puede dañar dicha membrana y producir la muerte del microbio.

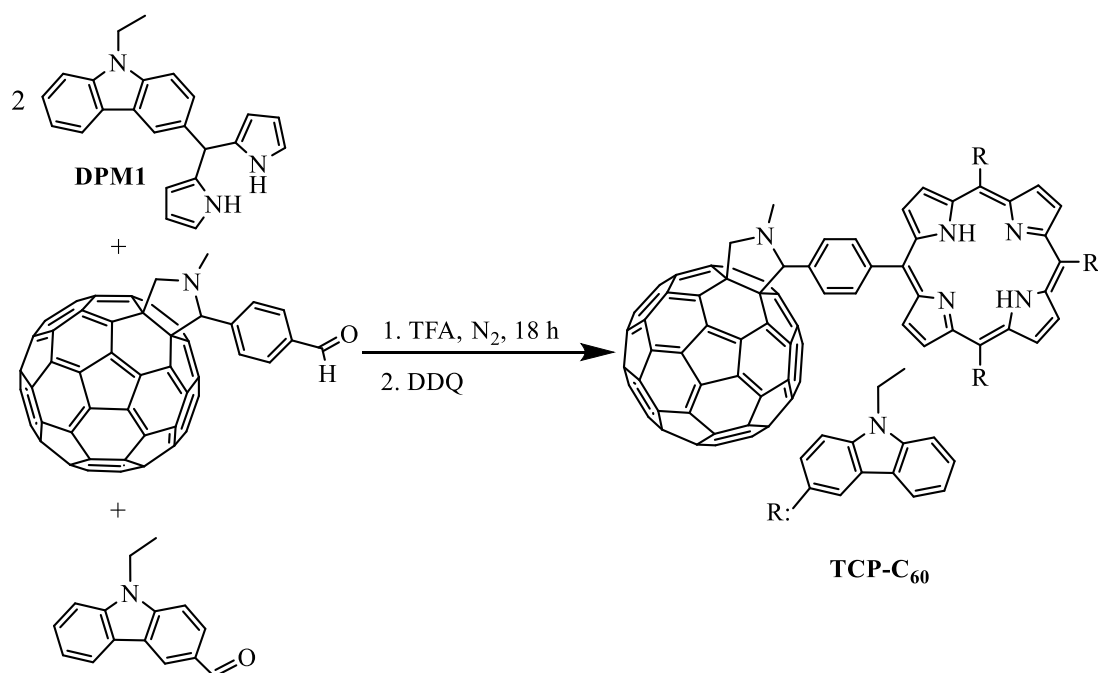
4.1. Síntesis de las díadas porfirina-fullereno C_{60} (TCP- C_{60} y TCP- C_{60}^{4+})

El primer diseño de síntesis para la obtención de la díada porfirina-fullereno C_{60} TCP- C_{60} , consistió en obtener un derivado del fullereno con un grupo funcional aldehído (FC1). (Esquema N°55). Esta reacción se llevó a cabo en tolueno seco a reflujo en atmósfera de nitrógeno. Luego de 7 h de reacción con agitación constante, se obtuvo el producto deseado. El mismo se purificó por cromatografía en columna *flash* usando gel de sílice como fase estacionaria y tolueno como fase móvil. El producto de interés se obtuvo con un 30% de rendimiento.



Esquema N°55. Síntesis del derivado del fullereno C_{60} con un grupo aldehído.

Por otro lado, se procedió con la síntesis del dipirrometano DPM1, para lo cual se llevó a cabo la condensación de *N*-etil-3-carbazolcarboxaldehído con un gran exceso de pirrol (relación molar aldehído/pirrol (1:47)), catalizada por el ácido TFA a temperatura ambiente. El producto de la reacción se purificó por cromatografía en columna *flash* empleando gel de sílice como fase estacionaria y la mezcla ciclohexano/acetato de etilo/TEA (80:20:1) como eluyente. El producto DPM1 se obtuvo con un 89% de rendimiento. Finalmente, se procedió a la síntesis de la díada TCP-C₆₀ a partir del DPM1, el derivado del fullereno C₆₀ y *N*-etil-3-carbazolcarboxaldehído (Esquema N°56). La primera etapa consistió en una condensación catalizada por ácido lo que permitió obtener el porfirinógeno correspondiente. La oxidación posterior con DDQ dio lugar a la díada de interés. Ésta se purificó por cromatografía en columna *flash* (gel de sílice como fase estacionaria y una elución por gradiente ciclohexano/tolueno/acetato de etilo/TEA como fase móvil) obteniéndose un sólido marrón con un rendimiento del 8% (Esquema N°56).

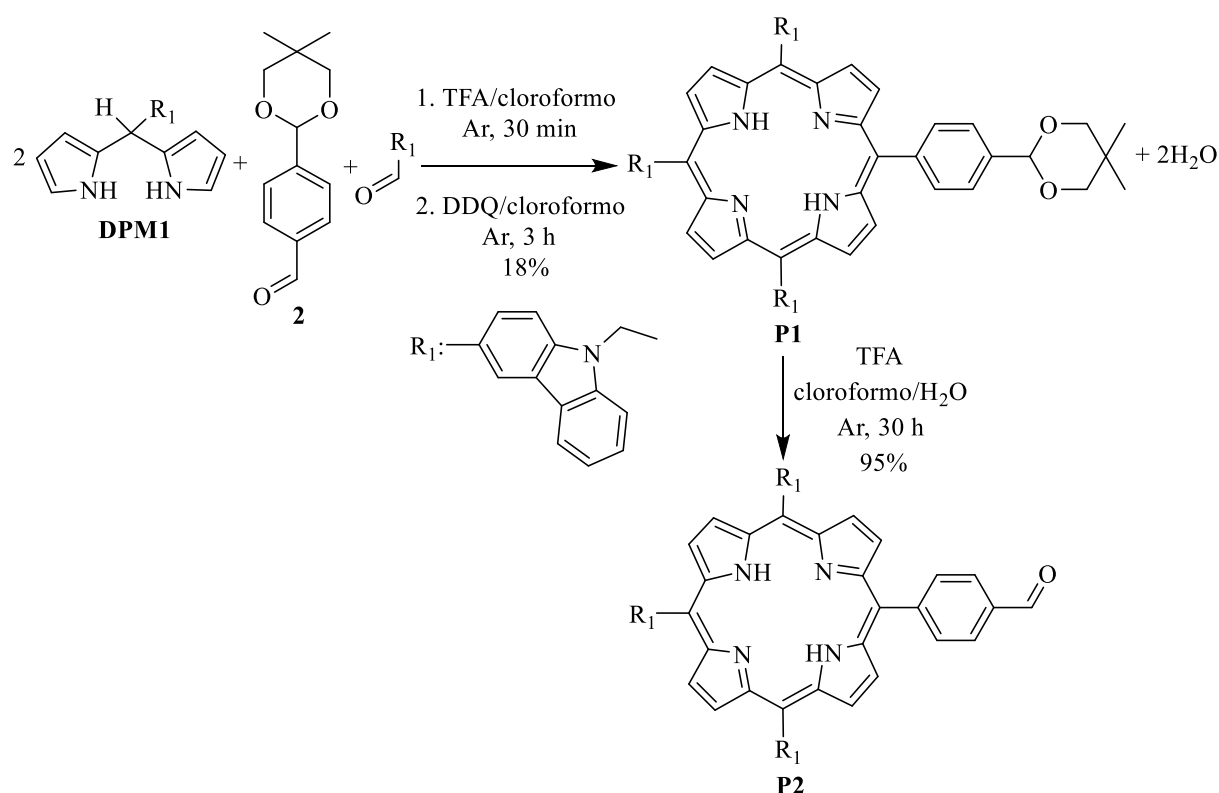


Esquema N°56. Primera metodología de síntesis empleada para obtener la díada TCP-C₆₀.

De esta manera, se sintetizó una díada porfirina-fullereno C₆₀ con tan solo 3 pasos de reacción. Sin embargo, la purificación es compleja, dado que las moléculas obtenidas: porfirinas con distintas simetrías (A₄, A₂B₂, AB₃), díadas y triadas formadas por porfirinas y fullereno C₆₀ y oligómeros lineales, tienen R_f muy similares. Otra desventaja de esta metodología de síntesis, es que la cantidad de producto de interés obtenido es limitado debido al bajo rendimiento de la reacción. Es por ello, que basados en la experiencia en síntesis orgánica adquirida hasta ese momento, se decidió planificar otro esquema de síntesis

con el objetivo de obtener la díada TCP-C₆₀ con un mayor rendimiento de reacción. Sin embargo, la nueva metodología se basa en 6 pasos. Este plan se ideó teniendo en cuenta que la síntesis de porfirinas implica una limitación por sí misma, dado que para macrociclos tetrapirrólicos con simetría AB₃, no es posible superar un rendimiento de reacción de entre 15-18%.²¹⁶ Por lo tanto, la etapa de condensación de una u otra manera, siempre va a estar limitando el rendimiento del producto final.

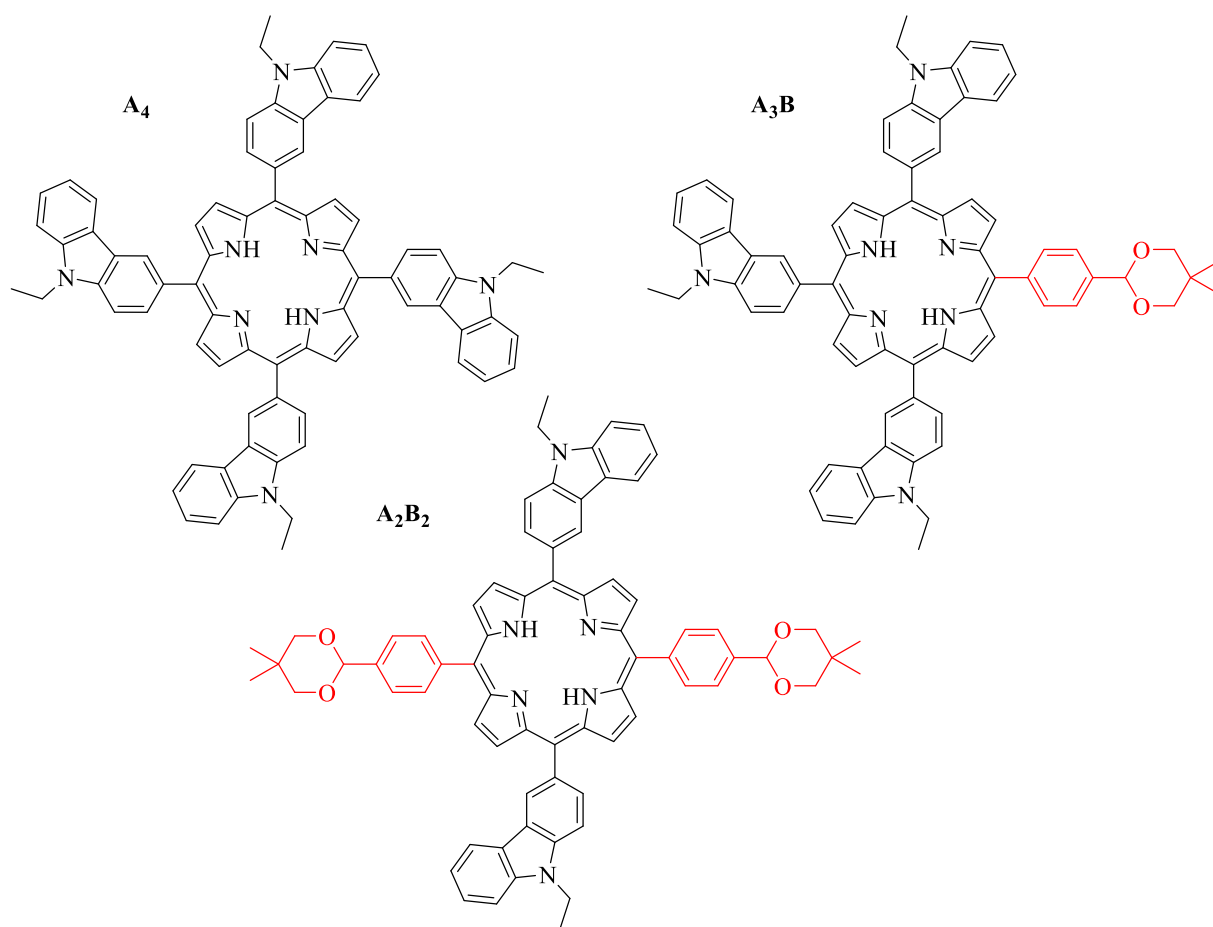
Los nuevos procedimientos sintéticos para la obtención de las porfirinas P1 y P2, que van a dar lugar a la díada, se resumen en el Esquema N°57. Las porfirinas con simetría AB₃ pueden ser convenientemente sintetizadas a partir de la condensación de un dipirrometano apropiado y una mezcla binaria de aldehídos catalizada por ácido.^{230, 393} La aplicación de este enfoque para la síntesis de la porfirina P1 requiere la formación previa del dipirrometano DPM1, cuyos pasos de síntesis y metodologías de purificación se detallaron en la sección 3.5.2.



Esquema N°57. Síntesis de la porfirina P1 y P2.

Por otro lado, una de las funciones aldehído del tereftaldicarboxaldehído se protegió para evitar obtener múltiples productos en la condensación de MacDonald [2+2] empleada para obtener la porfirina deseada.²⁴² Por lo tanto, la reacción entre el tereftaldicarboxaldehído y el 2,2-dimetilpropano-1,3-diol en presencia de una cantidad catalítica del ácido *p*-toluenosulfónico y calentando a reflujo en tolueno, dio el producto 4-

(4,4-dimetil-2,6-dioxano-1-il)benzaldehído (Esquema N°57, compuesto 2) con un rendimiento del 45%. La condensación catalizada por ácido entre el dipirrometano DPM1 y una mezcla binaria de *N*-etil-3-carbazolcarboxaldehído y el benzaldehído monoprotegido 2 permitió obtener la porfirina P1 (Esquema N°57). Para alcanzar un mayor rendimiento, la reacción se realizó con la relación molar 0.8:1.0:2.0 de *N*-etil-3-carbazolcarboxaldehído, benzaldehído 2 y dipirrometano DPM1, respectivamente. Similares relaciones molares se emplearon previamente para la obtención de porfirinas asimétricas.²³⁶ En primer lugar, la mezcla se hizo reaccionar con una cantidad catalítica de TFA a temperatura ambiente empleando cloroformo como solvente. El posterior tratamiento oxidativo con DDQ proporcionó una mezcla de tres porfirinas con distinta simetría: A₄, A₃B y A₂B₂. Los productos se separaron por cromatografía en columna *flash* (gel de sílice) usando un gradiente de elución. En primer lugar se empleó una mezcla de ciclohexano/cloroformo al 90% y luego cloroformo puro. En estas condiciones, la primera banda corresponde a TCP (porfirina simétrica A₄), la segunda banda púrpura a la porfirina deseada P1 (de simetría A₃B) obtenida con un rendimiento del 18% (Esquema N°57) y la tercera banda a la porfirina *trans*-A₂B₂ (Esquema N°58).



Esquema N°58. Estructuras químicas de porfirinas con simetría A₄, A₃B y A₂B₂.

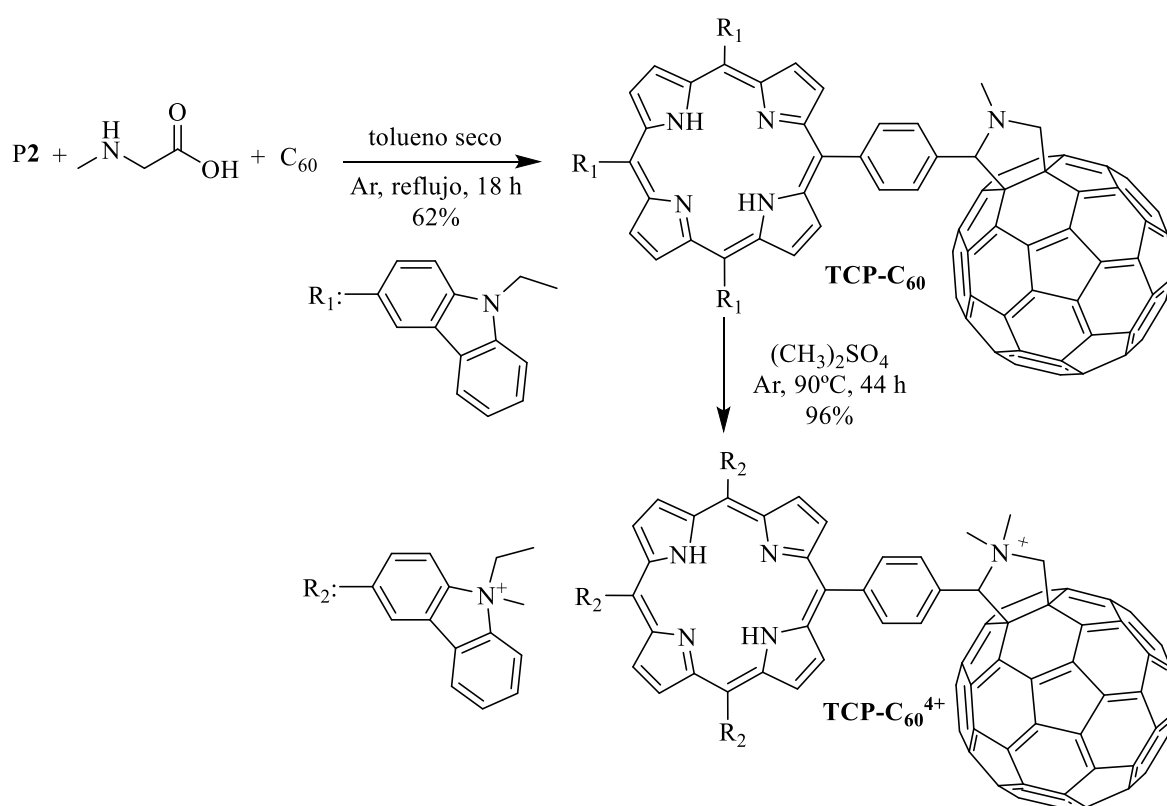
La hidrólisis del carbonilo protegido de la porfirina P1 en una mezcla heterogénea cloroformo/agua (1:1) en presencia de un exceso de TFA produjo la porfirina P2 (Esquema N°57) con un rendimiento del 95%, después de una agitación constante durante 30 h a temperatura ambiente.

En el año 1996, Prato y col. dan a conocer la síntesis de diferentes fulleropirrolidinas sustituidas mediante la cicloadición de azometinos.³⁹⁴ De las diferentes metodologías mediante las cuales se pueden sustituir los fullerenos C₆₀, la cicloadición 1,3-dipolar es la más empleada dada su versatilidad. Esta síntesis, da como producto un fullereno con un anillo pirrolidinio unido en posición 6,6.³⁹⁴ Dado que los sustituyentes azometinos son fáciles de obtener como material de partida, el anillo pirrolidinio puede ser fácilmente funcionalizado.³⁹⁴ En la síntesis que se llevó a cabo en esta tesis doctoral, la función del anillo pirrolidinio es unir covalentemente la porfirina con el fullereno C₆₀, es por ello que no se buscó una funcionalización adicional a dicho enlace. Una metodología similar se utilizó previamente para sintetizar distintos derivados de porfirina-fullereno C₆₀.^{242, 303} Una de las últimas díadas porfirina-fullereno C₆₀ con un anillo pirrolidinio que une covalentemente ambos cromóforos, es la sintetizada por Obondi, Lim y D'Souza.³⁹⁵ A esta molécula la construyeron con el objetivo de estudiar los procesos de transferencia de carga y de energía, además de evaluar el efecto que tiene en los mismos el hecho que la porfirina este coordinada con un metal.³⁹⁵

La porfirina unida covalentemente al fullereno C₆₀ se obtuvo mediante una cicloadición 1,3-dipolar entre la porfirina P2, *N*-metilglicina y fullereno C₆₀ en relación molar 1.0:1.9:1.0, respectivamente (Esquema N°59). La mezcla se disolvió en tolueno seco y se agitó durante 18 h a reflujo en atmósfera de argón. Esta mezcla de reacción produce la díada TCP-C₆₀ la cual se purificó por cromatografía en columna *flash* (gel de sílice como fase estacionaria y tolueno como fase móvil) obteniéndose un sólido marrón con un rendimiento del 62%.

La díada catiónica TCP-C₆₀⁴⁺ se obtuvo a partir de una metilación exhaustiva de TCP-C₆₀. Así, se trató TCP-C₆₀ con sulfato de dimetilo durante 44 h a 90 °C (Esquema N°59).¹⁹³ Mediante una precipitación con éter etílico, se obtuvo el producto deseado con un rendimiento del 96%. Generalmente, se emplea yoduro de metilo para proporcionar cargas positivas a los fotosensibilizadores, debido a que la síntesis es muy sencilla, el producto es fácil de purificar y el CH₃I es menos tóxico que el (CH₃)₂SO₄.^{170-171, 236, 396-397} Una vez transcurrido el tiempo de reacción necesario, el producto se seca mediante rotavapor y de esta manera se obtiene la molécula catiónica. Sin embargo, se observó que la díada TCP-C₆₀ no

se metila en su totalidad empleando yoduro de metilo luego de 72 h de reacción. Es por ello, que éste se reemplazó por sulfato de dimetilo, un agente metilante altamente efectivo. Sin embargo, la purificación empleando este reactivo no es tan sencilla y lleva mayor tiempo. Cabe destacar, que un mayor número de cargas positivas permite una correcta interacción entre el fotosensibilizador y las células bacterianas haciendo que la PDI sea más efectiva. Por lo tanto, se empleó sulfato de dimetilo como reactivo metilante para asegurarse de que la díada posea cuatro cargas positivas (TCP-C₆₀⁴⁺). En un trabajo previo, en donde un macrociclo tetrapirrólico está sustituido por grupos carbazol en posiciones *meso*, igual que la díada TCP-C₆₀, se empleó sulfato de dimetilo para sintetizar un fotosensibilizador tetracatiónico con muy buenos resultados.¹⁶²



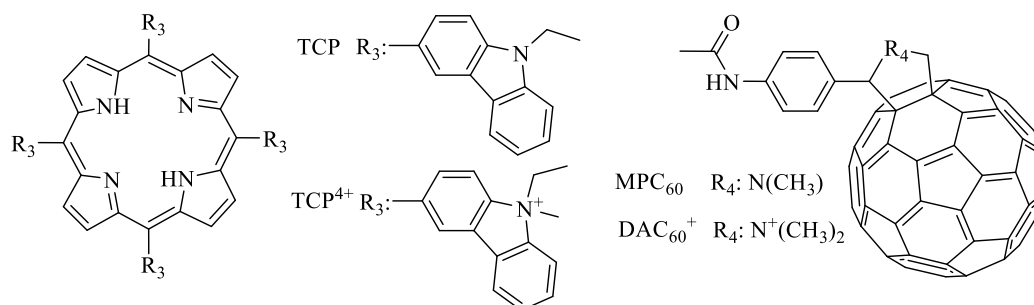
Esquema N°59. Síntesis de las díadas TCP-C₆₀ y TCP-C₆₀⁴⁺.

En TCP-C₆₀ y TCP-C₆₀⁴⁺, el macrociclo tetrapirrólico está sustituido por tres unidades de carbazol en las posiciones *meso*. Muchos compuestos heterocíclicos condensados que contienen un núcleo carbazol, han sido reportados para desarrollar una amplia gama de actividades biológicas importantes.³⁹⁸ Aquellas porfirinas que poseen unidades de carbazol periféricos, resultan eficientes para captar la luz debido a que estos grupos pueden actuar como antenas a bajas longitudes de onda.^{382, 399} Además, los átomos de nitrógeno en las unidades de carbazol permitieron obtener la díada TCP-C₆₀⁴⁺ que posee grupos cationicos en la periferia del macrociclo dando lugar a un fotosensibilizador anfifílico. Estos

compuestos tienen ciertas características que los hacen atractivos para una gran variedad de sistemas biológicos.³⁸⁵

4.2. Propiedades espectroscópicas de absorción y de fluorescencia

Los espectros de absorción de la díada TCP-C₆₀ y de los monómeros utilizados como modelos de la unidad de porfirina (TCP) y de fullereno C₆₀ (MPC₆₀) (Esquema N°60), se tomaron en dos solventes de diferente polaridad: DMF y tolueno.



Esquema N°60. Estructuras moleculares de TCP, TCP⁴⁺, MPC₆₀ y DAC₆₀⁺.

La absorción de la díada en la región UV del espectro ($\lambda=300-400$ nm) es mayor que la correspondiente a TCP debido a la presencia del C₆₀ (Figura N°17). Las unidades de fullereno presentan una banda de absorción en la región UV con un máximo a ~ 330 nm y otra banda débil a ~ 714 nm (espectro insertado en la Figura N°17A). Estas son debidas a transiciones del tipo $\pi-\pi^*$ y son características de este tipo de compuestos. En la región visible, el espectro de la díada coincide con el de la porfirina TCP observándose una banda *Soret* a ~ 430 nm, tanto en tolueno como en DMF (Figura N°17). Entre 515-650 nm aparecen cuatro bandas *Q* (*Q*_x (0,0), *Q*_x (1,0), *Q*_y (0,0) y *Q*_y (1,0)) que se asocian con una simetría D_{2h}.⁴⁰⁰⁻⁴⁰¹ Todas las bandas antes mencionadas son características de porfirinas base libre.⁴⁰² Además, el máximo de absorción de la banda *Soret* de la porfirina TCP, presenta un corrimiento batocrómico de 12 nm con respecto a TMP debido al efecto auxocrómico de los átomos de nitrógeno en los cuatro grupos carbazol.⁸¹

Los espectros de absorción de TCP-C₆₀ muestran una banda *Soret* angosta y definida, indicando que la díada se encuentra principalmente en estado monomérico, tanto en DMF como en tolueno (Figura N°17). Un pequeño efecto batocrómico de 2 nm en el máximo de la banda *Soret* se produjo en tolueno con respecto a DMF debido a un efecto solvatocrómico.³⁰⁴ Como se puede observar, el espectro de la díada es esencialmente una combinación lineal de los espectros de los monómeros correspondientes (TCP y MPC₆₀), con sólo pequeñas diferencias en los máximos de longitud de onda y en la forma de las bandas. Así, los espectros de absorción son consistentes con una interacción débil entre los

monómeros en el estado fundamental, indicando que ambos cromóforos retienen sus identidades individuales. Estos resultados coinciden con los encontrados en estudios previos para díadas porfirina-fullereno C_{60} con estructuras similares.⁴⁰³⁻⁴⁰⁴

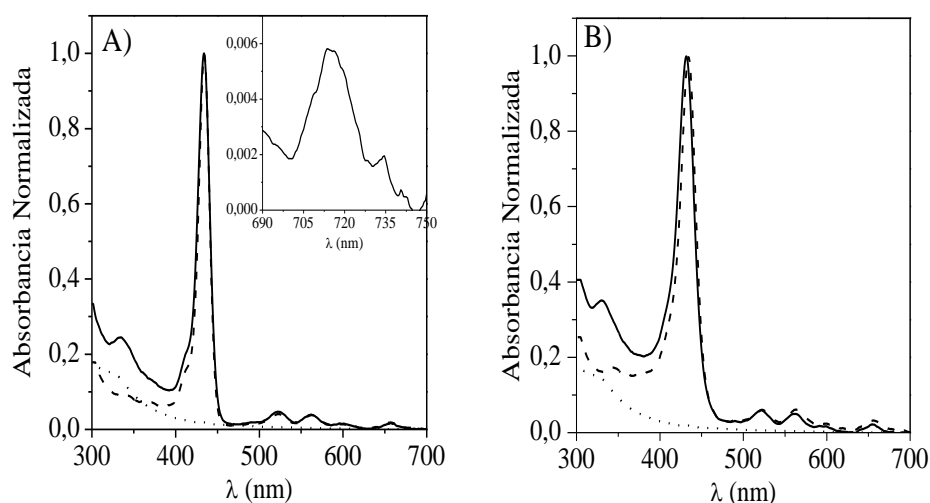


Figura N°17. Espectros de absorción UV-visible de díada TCP- C_{60} (línea continua), TCP (línea discontinua) y MAC₆₀ (línea de puntos) (A) en tolueno y (B) en DMF. Inserto en (A) Espectro de absorción de TCP- C_{60} , banda característica del fullereno C_{60} .

En la Figura N°18 se muestran los espectros de absorción en DMF de TCP- C_{60}^{4+} en comparación con los correspondientes monómeros TCP⁴⁺ y DAC₆₀⁺ con cargas positivas. El espectro de la díada TCP- C_{60}^{4+} en este solvente polar retiene las características antes mencionadas para TCP- C_{60} .

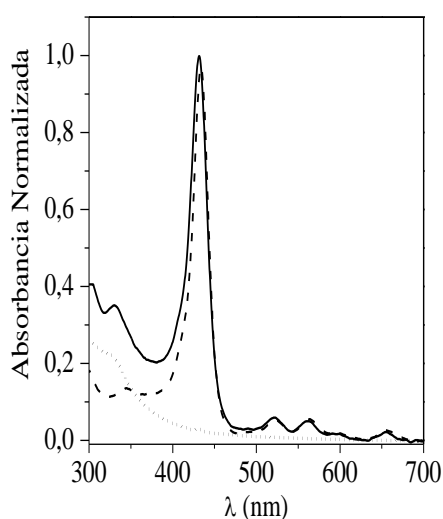


Figura N°18. Espectros de absorción UV-visible de TCP- C_{60}^{4+} (línea continua), TCP⁴⁺ (línea discontinua) y DAC₆₀⁺ (línea de puntos) en DMF.

Por otro lado, en la Figura N°19 se observan los espectros de TCP- C_{60} y TCP- C_{60}^{4+} en micelas inversas de tolueno/AOT (0,1M)/agua ($W_0=10$). La forma de las bandas de absorción de la díada TCP- C_{60} en el medio micelar es muy similar al encontrado en tolueno.

Por el contrario, la díada catiónica presenta dos bandas nuevas en tolueno, un pico más intenso a 357 nm y un hombro a 467 nm, posiblemente debido a una agregación parcial en este solvente menos polar. Sin embargo, en micelas inversas de tolueno/AOT estas bandas desaparecen casi por completo (Figura N°19) y el espectro de absorción de TCP-C₆₀⁴⁺ se asemeja al obtenido en DMF donde TCP-C₆₀⁴⁺ se encuentra principalmente como monómero (Figura N°18).

Desde el siglo XX, se viene investigando cómo influyen las micelas en la agregación de las porfirinas.⁴⁰⁵⁻⁴⁰⁶ En un trabajo previo, se estudiaron dos porfirinas anfifílicas con grupos carboxilo en micelas inversas de AOT/isooctano/agua.⁴⁰⁷ Este sistema imita los microambientes presentes en los organismos vivos y, permite estudiar cómo influyen las propiedades anfifílicas de porfirinas en la PDT. La desactivación del estado excitado de las porfirinas por parte del metil viológeno y los experimentos de láser *flash* fotolisis, muestran que la molécula, con una longitud de cadena lateral más larga, se incorpora más en la región interfacial de micelas inversas de AOT. Esta interacción le permite a las porfirinas agregadas pasar a la forma monomérica.⁴⁰⁷ Por consiguiente, el decaimiento del estado excitado es más lento y aumenta la eficacia del fotosensibilizador en la PDT. Así, estos resultados muestran el efecto que producen las propiedades anfifílicas de las micelas sobre el estado excitado de las porfirinas y dejan ver uno de los beneficios de emplear moléculas anfifílicas como fármacos efectivos para la PDI.⁴⁰⁷

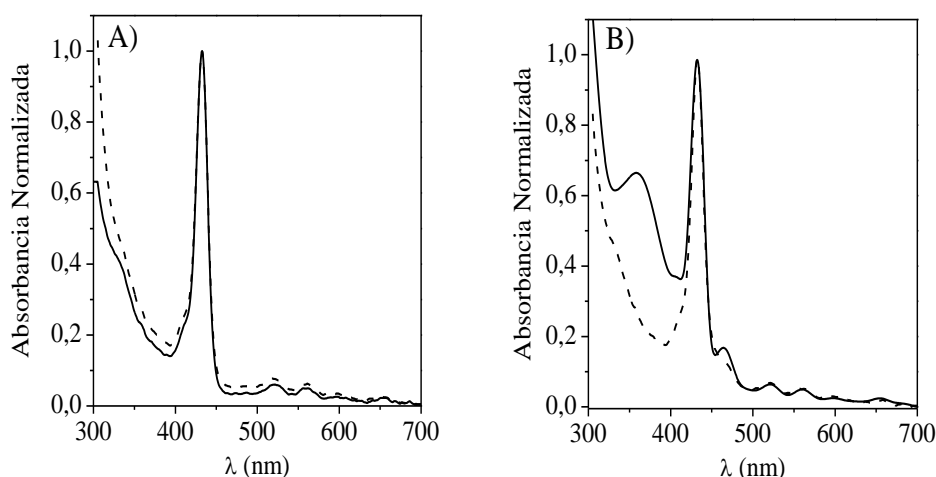


Figura N°19. Espectros de absorción UV-visible. (A) TCP-C₆₀ en tolueno (línea continua) y en micelas inversas de AOT (línea discontinua). (B) TCP-C₆₀⁴⁺ en tolueno (línea continua) y en micelas inversas de AOT (línea discontinua).

Los espectros de emisión de fluorescencia de las dos díadas, la neutra y la catiónica, se compararon en DMF con las porfirinas modelo (TCP y TCP⁴⁺), excitando las muestras a 550 nm (Figura N°20). Las dos bandas alrededor de 665 y 730 nm son características de

porfirinas sustituidas en posición *meso*.³⁹⁹ Estas bandas han sido asignadas a las transiciones $Q_x(0-0)$ y $Q_x(0-1)$.⁴⁰¹ Este comportamiento es típico de porfirinas base libre con simetría D2h e indica que la estructura vibrónica de la misma se mantiene prácticamente sin cambios tras la excitación.⁴⁰⁰ A partir de las longitudes de onda de la última banda de absorción y la primera banda de emisión ($Q_x(0-0)$), se determinó un desplazamiento de Stokes de ~ 10 nm para ambas díadas. Pequeños cambios indican que en estas moléculas la energía de absorción es similar a la energía de relajación del estado excitado singlete de más baja energía (S_1), lo que está de acuerdo con la estructura plana y rígida del macrociclo tetrapirrólico. Eso sugiere que sólo una relajación geométrica menor se produce en el primer estado excitado. Un comportamiento similar se observó en tolueno. En ambos casos no se evidenció la emisión del fullereno C_{60} , esto se debe a que su banda característica es de muy baja intensidad ($\Phi_F \sim 1 \times 10^{-4}$) y además a que se superpone con la banda de emisión a ~ 750 nm de las porfirinas.³⁰¹

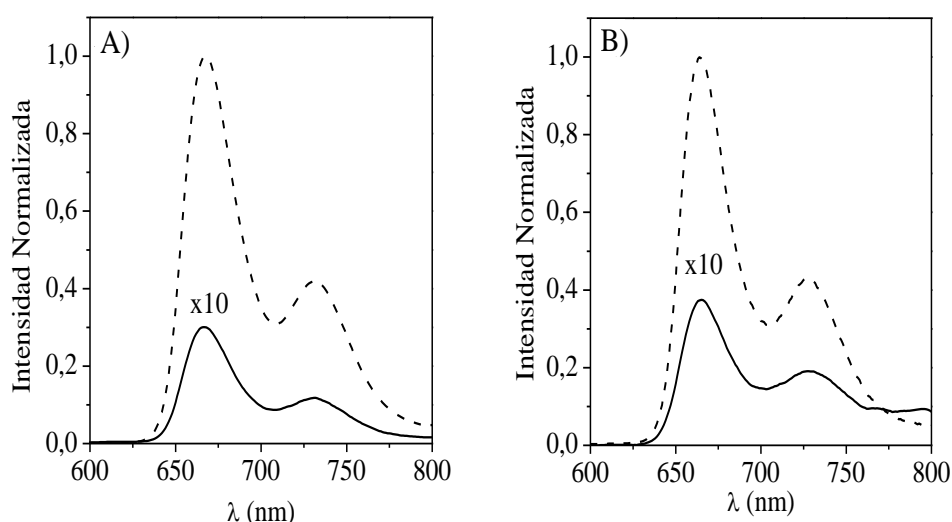


Figura N°20. Espectros de emisión de fluorescencia en DMF de (A) TCP- C_{60} (línea continua) y TCP (línea discontinua) y, (B) TCP- C_{60}^{4+} (línea continua) y TCP $^{4+}$ (línea discontinua). $\lambda_{exc}=550$ nm.

Los Φ_F de estos fotosensibilizadores se calcularon en DMF y en tolueno empleando como referencia la porfirina TMP (Tabla N°2). Los valores de (Φ_F) para TCP y TCP $^{4+}$ están de acuerdo con aquellos reportados con anterioridad para derivados de porfirina similares.¹⁶² Por el contrario, ambas díadas muestran una emisión muy débil del resto de porfirina, lo que indica una desactivación del estado excitado singlete de la porfirina por parte del fullereno C_{60} unido covalentemente. La eficiencia del *quenching* en DMF se estimó en $\eta_q > 0,96$. Estos valores son análogos a los descritos anteriormente para los derivados de porfirina unidos covalentemente a la estructura del fullereno.^{403, 408} En estos casos, la transferencia de energía desde el estado excitado singlete de la porfirina al fullereno C_{60} es un proceso exotérmico.

Cabe destacar que la eficiencia en la transferencia de energía depende de la longitud del espaciador, de su rigidez y de la ubicación de los monómeros que conforman a una díada en el espacio.³⁰⁰

Se calculó la energía del estado excitado singlete de la porfirina (E_s) teniendo en cuenta la energía de las transiciones electrónicas 0-0 (Tabla N°2). La variación de la energía libre para el estado de separación de carga ($TCP^{*+}-C_{60}^{*-}$) se calculó a partir de la energía de formación del radical catión y el radical anión utilizando la ecuación simplificada de Rehm-Weller,⁴⁰⁹

$$\Delta G = \exp [E_0 (P^{*+}/P) - E_0 (C_{60}/C_{60}^{*-})] - E_s \quad (15)$$

donde $E_0 (P^{*+}/P)$ es el primer potencial de oxidación del donante (0,67 V, DCE, SCE)³⁹⁹, $E_0 (C_{60}/C_{60}^{*-})$ es el primer potencial de reducción del aceptor (-0,59 V, DCE, SCE)⁴¹⁰ y E_s es la energía del estado singlete de la porfirina (1,88 eV).^{409, 411} Para la transferencia de carga desde la $^1TCP^*$ al fullereno C_{60} , se obtuvo un valor de $\Delta G = -0,62$ eV lo que estaría indicando que el proceso de transferencia de carga entre los monómeros es favorable. En este caso, no se incluye el término difusional en la ecuación (15) dado que dador y aceptor están unidos por un espaciador fijo.⁴¹¹

Tabla N°2. Propiedades espectroscópicas de los fotosensibilizadores en distintos medios.

Fotosensibilizador	Solvente	TCP	TCP- C_{60}	TCP- C_{60}^{4+}
λ_{max}^{Soret} (nm)	DMF	434	431	432
λ_{max}^{Soret} (nm)	tolueno	434	434	433
ϵ^{Soret} ($M^{-1}cm^{-1}$)	DMF	$2,81 \times 10^5$	$2,52 \times 10^5$	$2,49 \times 10^5$
λ_{max}^{Em} (nm)	DMF	667	667	664
λ_{max}^{Em} (nm)	tolueno	666	665	664
E_s (eV)	DMF	1,88	1,88	1,88
Φ_F	DMF	$0,12 \pm 0,02$	$(4,2 \pm 0,3) \times 10^{-3}$	$(4,9 \pm 0,3) \times 10^{-3}$
Φ_F	tolueno	$0,15 \pm 0,02$	$(5,1 \pm 0,4) \times 10^{-3}$	$(3,5 \pm 0,2) \times 10^{-3}$

Imahori y col. estudiaron en díadas porfirinas-fullereno C_{60} , el efecto que produce la polaridad del solvente en la formación de un estado de separación de carga fotoinducido y en el proceso de recombinación.³⁰³ Los autores trabajaron con tres solventes distintos. Los procesos de fotoinducción producidos en una díada que llamaron $ZnP-C_{60}$, se estudiaron

mediante mediciones de tiempos de vida de fluorescencia y espectroscopias de absorción transitorias resueltas en el tiempo. Los investigadores encontraron que independientemente de la polaridad del disolvente, el estado de separación de carga se forma vía transferencia de electrones desde el estado excitado singlete de la porfirina al fullereno C_{60} .³⁰³ Sin embargo, el estado de separación de carga resultante tiene un determinado tiempo de vida en función del nivel de energía de este estado en comparación con los estados excitados singlete y triplete del fullereno C_{60} . En solventes no polares como el benceno, el estado de separación de carga experimenta una recombinación de carga para producir el estado excitado singlete del C_{60} , el cual experimenta un entrecruzamiento entre sistemas para dar lugar al estado excitado triplete del C_{60} .³⁰³ Por otro lado, en un solvente más polar como el anisol, el nivel de energía del estado de separación de carga es inferior al estado excitado singlete del fullereno C_{60} , dando como resultado la formación directa del estado excitado triplete del C_{60} . En un solvente polar como benzonitrilo, el nivel de energía del estado de separación de carga es bajo comparado con el estado excitado triplete del C_{60} . Así el estado de separación de carga, producido por la excitación de ambos cromóforos, decae directamente al estado fundamental. Esta dependencia de los procesos de recombinación de carga en la díada ZnP- C_{60} con la polaridad del solvente, puede ser racionalizada en pequeñas energías de reorganización de porfirinas y fullerenos en procesos de transferencia de electrones.³⁰³ Este mismo resultado se observó con las díadas TCP- C_{60} y TCP- C_{60}^{4+} en dos solventes de distinta polaridad (DMF y tolueno).

4.3. Fotólisis en estado estacionario en presencia de un aceptor y un dador de electrones

Para evaluar la capacidad de las díadas TCP- C_{60} y TCP- C_{60}^{4+} de formar un estado de separación de carga fotoinducido, se estudió la fotólisis de ambas en estado estacionario en presencia de una molécula aceptora y otra dadora de electrones. Esta manera de estudiar sistemas en los que ocurren transferencia de electrones, ha sido llevada a cabo con distintas moléculas complejas.⁴¹² El ensayo se llevó a cabo en un medio polar formado por una mezcla de DMF y agua al 5%. El metil viológeno (MV^{2+}) se utilizó como un aceptor de electrones. El potencial de reducción del fullereno C_{60} en la díada es de -0,59 V y el del metil viológeno -0,44 V, estos datos indican que la transferencia de electrones desde el fullereno al MV^{2+} es un proceso exotérmico con un valor de 0,15 eV. En la misma solución, se agregó NADH, el cual actuó como una molécula dadora de electrones externa cuyo potencial de reducción es de 0,32 V.⁴¹³ Por lo tanto, se espera que la transferencia de electrones desde el NADH a la porfirina TCP en la díada (0,67 V) sea exotérmica con un valor de 0,35 eV. En estas

condiciones, el estado de separación de carga fotoinducido se obtuvo al irradiar la banda *Soret* de la díada con luz monocromática ($\lambda_{irr} = 433 \pm 5$ nm) en ausencia de oxígeno (Figura N°21). En presencia de $O_2(^3\Sigma_g^-)$ la reducción del MV^{2+} no se observa debido a que el oxígeno cataliza el proceso de vuelta de la transferencia de electrones (conocido como BET por sus siglas en inglés *Back Electron Transfer*) entre $C_{60}^{\bullet-}$ y $TCP^{\bullet+}$.⁴¹⁴

La oxidación de NADH y la reducción del MV^{2+} estuvieron acompañadas por la oxidación de TCP y por la reducción del fullereno C_{60} . Cuando el sistema TCP- $C_{60}/MV^{2+}/NADH$ se irradió, se observó un aumento en las bandas de absorción características del radical catión del metil viológeno ($MV^{\bullet+}$) una a ~ 400 nm y la otra a ~ 610 nm (Figura N°21). Aunque la díada TCP- C_{60} está parcialmente agregada debido a la adición de un 5% de agua a la solución, lo cual se pone de manifiesto por la disminución en la absorbancia de la banda *Soret* de la porfirina, fue posible observar la formación del $MV^{\bullet+}$. La concentración del $MV^{\bullet+}$ alcanza un valor constante, no debido a la destrucción del fotosensibilizador, sino probablemente debido a la aparición de otras reacciones que involucran al $MV^{\bullet+}$. Cabe destacar que las soluciones antes descritas, en la oscuridad no evidenciaron la formación de un estado de separación de carga. Tampoco se observó la formación del radical catión del metil viológeno cuando la solución se irradió en ausencia de la díada TCP- C_{60} . Además, no se evidenció reacción cuando la díada se irradió sólo con el aceptor o con el dador de electrones (resultados no mostrados).

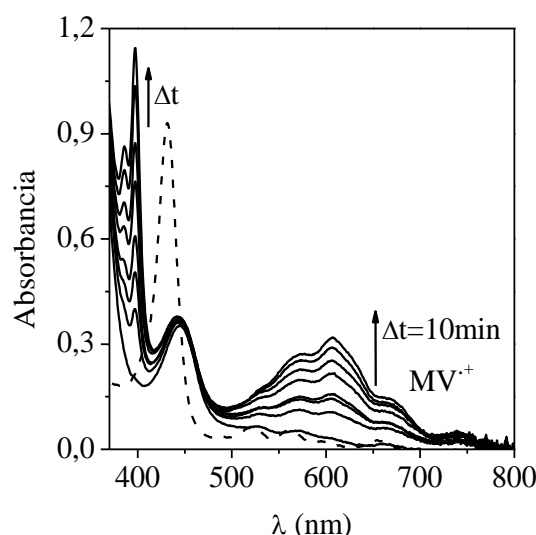


Figura N°21. Cambios en el espectro de absorción de la díada TCP- $C_{60} + MV^{2+} + NADH$ en DMF-agua (5%). $\lambda_{irr} = 433 \pm 5$ nm.

En un trabajo previo, se demostró que el radical anión del fullereno ($C_{60}^{\bullet-}$) formado tanto en la díada $ZnP^{\bullet+}-C_{60}^{\bullet-}$ como en la triada $ZnP^{\bullet+}-H_2P-C_{60}^{\bullet-}$ disueltas en benzonitrilo, luego de la irradiación con luz, experimenta una oxidación en presencia de hexil viológeno

(HV^{2+}), mientras que el radical catión de la porfirina coordinada con zinc (ZnP^{+}) es reducido por 1-bencil-1,4-dihidronicotinamida y por 10-metil-9,10-dihidroacridina, dos análogos del NADH. Estos resultados, ponen de manifiesto que mediante estudios de fotólisis en estado estacionario en presencia de un aceptor y un dador de electrones es posible verificar la formación de estados de separación de carga fotoinducidos en díadas.⁴¹⁵ Por otro lado Panagiotis y col., demostraron que existe una transferencia de carga intramolecular entre pireno y C_{60} dejando ver la habilidad de los fullerenos de aceptar electrones.⁴¹⁶

Con $TCP-C_{60}^{4+}$ no se observa la formación de un estado de separación de carga. Esto puede ser debido a que el NADH, que posee dos grupos fosfatos cargados negativamente, está interaccionando electrostáticamente con la díada con cargas positivas. También puede ocurrir que el MV^{2+} , también cargado positivamente se repela con la molécula del fotosensibilizador y que por lo tanto la transferencia de cargas no sea efectiva. Es por ello, que los mismos estudios antes descriptos se llevaron a cabo con $TCP-C_{60}^{4+}$ pero en presencia de un dador de electrones neutro, la TMN.³⁸⁰ El potencial de reducción de esta molécula para dar lugar al monocatión es de 0,43 V.³⁸⁰ Es así, que el proceso de transferencia del electrón desde la TMN a TCP es exotérmico con un valor de 0,24 eV. Los resultados obtenidos con ambas díadas se observan en la Figura N°22.

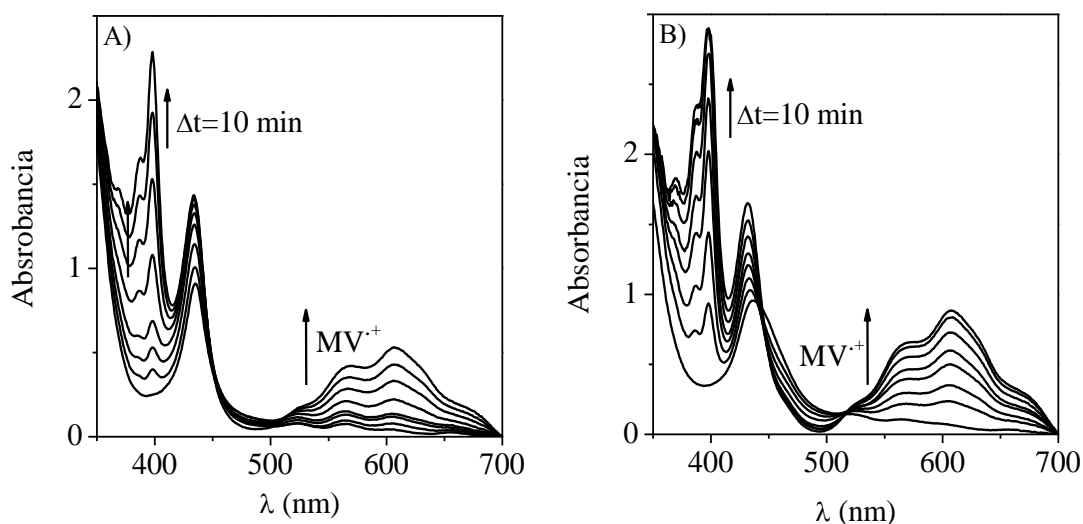


Figura N°22. Cambios en el espectro de absorción de las díadas (A) $TCP-C_{60}$ y (B) $TCP-C_{60}^{4+}$, disueltas en una solución de DMF-agua (5%) con MV^{2+} y TMN, al ser irradiadas con luz visible.

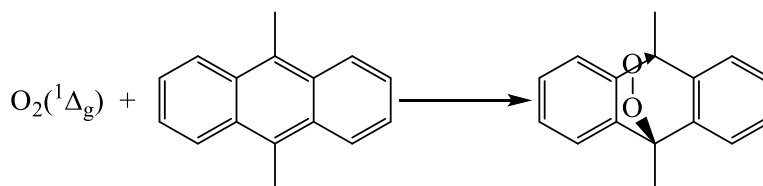
La aparición de las bandas características del radical catión del metil viológeno para $TCP-C_{60}$, confirma una vez más su capacidad de formar un estado de separación de carga fotoinducido en un medio polar. Por otro lado, cuando el sistema $TCP-C_{60}^{4+}/MV^{2+}/TMN$ se irradió con luz visible, se observó un incremento en la absorbancia de las bandas del MV^{+}

($\lambda_{\text{max}} \sim 400$ and 610 nm). Por lo tanto, la díada catiónica es capaz de formar un estado de separación de carga. Además, podemos concluir que no se evidenció una transferencia de electrones entre TCP-C_{60}^{4+} y NADH porque estas moléculas interactúan electrostáticamente. Resultados similares a los encontrados con TCP-C_{60} y TCP-C_{60}^{4+} , se presentaron previamente con una díada $\text{Zn(II)porfirina-fullereno C}_{60}$, donde el macrociclo tetrapirrólico está formando un complejo con zinc. En este caso, la eficiencia de la transferencia de carga se vio favorecida por la presencia del metal.³⁰¹

En el presente año, Wang y col. llevaron a cabo estudios de transferencia de electrones en micelas formadas por interacciones electrostáticas entre $\text{Zn(II)tetrakis(4-sulfonaftil)porfirina}$ (ZnTPPS), un fullereno sustituido (mC_{60}) y poli(etilenglicol)-*block*-poli(L-lisina) (PEG-b-PLys).⁴¹⁷ Dada la naturaleza del sistema, es soluble en agua estando los fotosensibilizadores encapsulados dentro de la micela, lo que asegura una migración de energía efectiva entre las moléculas. Para evaluar la capacidad de esta micela de formar un estado de separación de carga fotoinducido, se llevaron a cabo ensayos de fotólisis en estado estacionario en presencia de un aceptor de electrones, el MV^{2+} y de un dador, trietanolamina (TEOA). Al irradiar el sistema bajo estudio en ausencia de oxígeno, los autores encontraron un aumento en la banda de absorción a 605 nm, la cual se atribuye a la formación de MV^{+} . Por lo tanto, en la micela existe una transferencia de electrones desde la porfirina coordinada con zinc, al fullereno C_{60} .⁴¹⁷

4.4. Fotooxidación de DMA

El valor del rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) de un fotosensibilizador, puede determinarse a partir del análisis cuantitativo de reacciones que ocurren entre un sustrato y el $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. En este caso, se siguió espectroscópicamente la disminución de la absorbancia de DMA, el cual es un sustrato que desactiva químicamente al $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ a través de una reacción de Diels-Alder (cicloadición $[4+2]$) dando como producto el endoperoxido correspondiente (Esquema N°61).⁴¹⁸



Esquema N°61. Reacción de DMA con $\text{O}_2(^1\Delta_g)$.

La fotooxidación del DMA inducida por porfirinas y díadas se estudió en tolueno y en

DMF en condiciones aeróbicas. Las muestras se irradiaron a 428 ± 5 nm, longitud de onda a la cual la especie que absorbe es principalmente el macrociclo tetrapirrólico. Por lo tanto, los procesos fotofísicos en ambas díadas se iniciaron a partir de la unidad de porfirina. La fotodegradación de DMA se siguió monitoreando su descomposición a partir de los espectros de absorción (Figura N°23). En estos espectros se observa que la absorbancia del DMA disminuye a medida que aumenta el tiempo de irradiación, lo que da un indicio de que se está formando el endoperóxido correspondiente, el cual no posee absorbancia. Sin embargo, la banda *Soret* de la díada TCP-C₆₀, no varía con el aumento en el tiempo de irradiación, lo que pone de manifiesto que el fotosensibilizador no se descompone por el efecto de la luz en el tiempo (*photobleaching*). En todos los casos estudiados, la fotooxidación sigue una cinética de *pseudo* primer orden a una longitud de onda de 379 nm con respecto a la concentración de DMA. A partir de los gráficos característicos (Figura N°24), que describen el progreso de la reacción del DMA, se calcularon los valores de k_{obs} para cada fotosensibilizador (Tabla N°3). Teniendo en cuenta que este sustrato es un desactivador de $O_2(^1\Delta_g)$ por reacción química exclusivamente, es un método utilizado para evaluar la capacidad de los fotosensibilizadores de producir $O_2(^1\Delta_g)$ en solución.

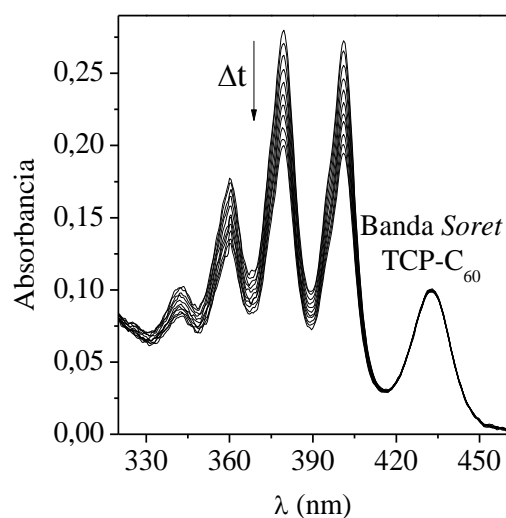


Figura N°23. Fotooxidación del DMA fotosensibilizada por TCP-C₆₀ cada 2 min de irradiación ($\lambda_{irr}=428\pm 5$ nm) en tolueno.

En tolueno, la díada TCP-C₆₀ produjo la descomposición de DMA de manera eficiente, mientras que no se detectó reacción usando TCP-C₆₀⁴⁺ como fotosensibilizador. La díada catiónica no se encuentra completamente disuelta como monómero en tolueno como se puede observar en su espectro de absorción (Figura N°19B). Es posible que esta agregación parcial inhibió la actividad fotodinámica de este fotosensibilizador en tal medio. Por otro lado en DMF, donde las díadas se encuentran fundamentalmente como monómeros, las

velocidades de fotooxidación de DMA medidas para ambas díadas disminuyen considerablemente en comparación con la de TCP. Por lo tanto, en este solvente más polar, debe estar participando un proceso competitivo como un estado de separación de carga fotoinducido desde la porfirina al fullereno C₆₀ (sección 4.3.).

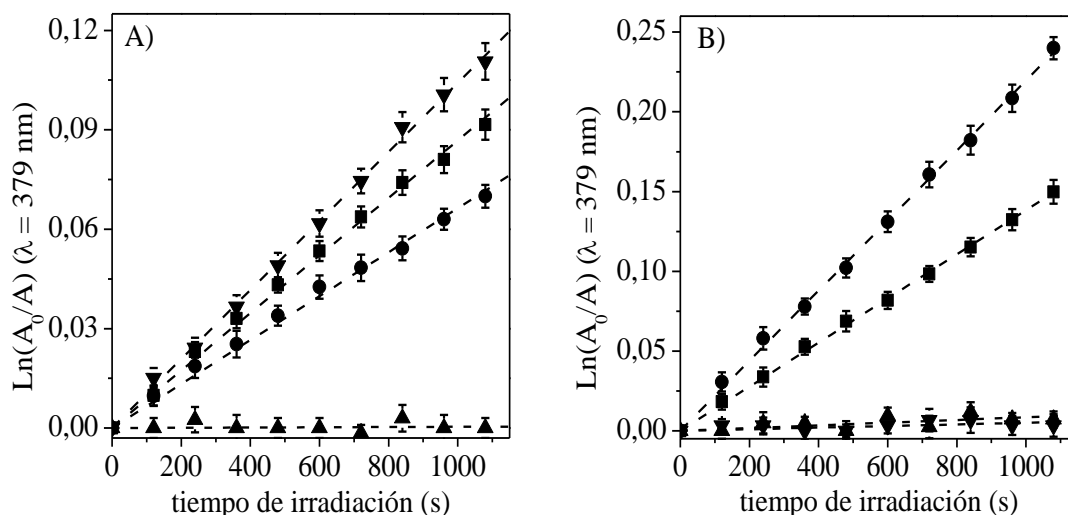


Figura N°24. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de DMA (35 μM) fotosensibilizada por TCP-C₆₀ (▼), TCP-C₆₀⁴⁺ (▲), TCP (■) y TMP (●) en (A) tolueno y (B) DMF; $\lambda_{irr}=428\pm5$ nm.

Se utilizaron los datos cinéticos de descomposición de DMA para estimar el rendimiento cuántico de producción de O₂(¹Δ_g). Los valores de Φ_{Δ} se calcularon mediante la comparación de la pendiente obtenida para cada fotosensibilizador con el valor correspondiente a la porfirina de referencia TMP (Figura N°24). Se obtuvieron valores comparables de Φ_{Δ} para TCP en ambos solventes (Tabla N°3). Estos resultados están de acuerdo con los encontrados en estudios previos para porfirinas base libre disueltas como monómeros.⁴¹⁹ Un valor de Φ_{Δ} similar se reportó previamente para TCP en DMF.¹⁶² Por otro lado, en este solvente la producción de O₂(¹Δ_g) disminuye significativamente para las díadas con respecto a TCP. En el caso de la díada TCP-C₆₀, el valor de Φ_{Δ} se puede comparar en ambos solventes y fue 56 veces más bajo en DMF que en tolueno. Además, la producción de Φ_{Δ} por TCP-C₆₀ fue 41 veces menor que la encontrada para TCP en DMF (Tabla N°3). Por el contrario, se calculó un valor de $\Phi_{\Delta}=0,020\pm0,003$ para la díada TCP-C₆₀⁴⁺ en el medio más polar. Estos comportamientos se pueden atribuir a la formación de un estado de separación de carga fotoinducido que se ve favorecido en solventes polares.³⁰² Por otro lado, no se pudo obtener un valor de Φ_{Δ} para TCP-C₆₀⁴⁺ en tolueno por problemas de agregación (Figura N°19B). Por lo tanto, el Φ_{Δ} en ambas díadas es fuertemente dependiente de la polaridad del microambiente donde se localizan y de su estado de agregación.

Tabla N°3. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de DMA (k_{obs}) y rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) en diferentes medios.

Fotosensibilizador	TCP	TCP-C ₆₀	TCP-C ₆₀ ⁴⁺
$k_{obs}^{\text{tolueno}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$(0,66 \pm 0,01) \times 10^{-4}$	$(0,87 \pm 0,01) \times 10^{-4}$	NR ^a
$\Phi_{\Delta}^{\text{tolueno}}$	$0,42 \pm 0,02^b$	$0,56 \pm 0,02$	-
$k_{obs}^{\text{DMF}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$(1,38 \pm 0,01) \times 10^{-4}$	$(5,0 \pm 0,9) \times 10^{-6}$	$(8,0 \pm 0,9) \times 10^{-6}$
$\Phi_{\Delta}^{\text{DMF}}$	$0,41 \pm 0,02^c$	$0,010 \pm 0,002$	$0,020 \pm 0,003$

^aReacción indetectable, ^busando TMP como referencia $k_{obs}^{\text{tolueno}} = (1,04 \pm 0,01) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$,

^cempleando TMP como referencia $k_{obs}^{\text{DMF}} = (2,20 \pm 0,02) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

Dado que estas díadas no son empleadas habitualmente para la inactivación fotodinámica de microorganismos, hay muy poca bibliografía respecto a estos tipos de ensayos. Sin embargo, hay evidencia de una díada porfirina-fullereno C₆₀ sintetizada por Milanesio y col., con grupos 4-metoxifenilos en posiciones *meso* de la porfirina. Los autores probaron la capacidad de esta díada para ser empleada como fotosensibilizador para la PDT en la línea celular Hep-2 de carcinoma de laringe humano.³⁰⁴ Para evaluar la capacidad de esta molécula de producir O₂(¹Δ_g), tanto en DMF como el tolueno, los investigadores llevaron a cabo una metodología similar a la aquí descripta. La díada P-C₆₀ produce eficientemente O₂(¹Δ_g) con un $\Phi_{\Delta}=0,80$ en tolueno, mientras que en DMF el $\Phi_{\Delta}=0,18$.³⁰⁴ Este último resultado se debe a que en un medio polar se ve favorecida la formación de un estado de separación de carga fotoinducido. Los estudios de fotooxidación de DMA permitieron determinar la producción de oxígeno singlete por parte de la unidad de porfirina que forma la díada, tanto en tolueno como en DMF, empleando como molécula modelo la TMP. Este compuesto, posee valores de rendimiento de O₂(¹Δ_g) similares en ambos solventes, $\Phi_{\Delta}=0,67$ (DMF) y $\Phi_{\Delta}=0,62$ (tolueno).³⁰⁴ Tanto en este trabajo como en los estudios que se presentan en esta tesis, es posible observar que las díadas poseen un mayor Φ_{Δ} en un medio no polar que la porfirina simétrica análoga.

4.5. Solubilidad y actividad fotodinámica de las díadas en micelas inversas de AOT

Debido a que muchos procesos biológicos se producen en la superficie de las membranas o dentro de su cavidad hidrofóbica, se analizó la solubilidad y la distribución de las díadas en micelas inversas de tolueno/AOT (0,1 M)/agua (W₀=10). Los medios microheterogéneos de AOT se utilizan como un modelo muy simplificado de microgotas de agua que se encuentran dentro de las membranas biológicas.^{163, 247} En las estructuras

micelares la presencia de grupos con una cabeza polar y con una cadena hidrofóbica permite estudiar la afinidad de una gran variedad de fotosensibilizadores por la interfaz micelar. En un sistema micelar un soluto puede estar situado en distintos microambientes: en el disolvente orgánico externo, en el *pool* acuoso o en la interfaz micelar.⁴²⁰⁻⁴²²

Así, se estudió el efecto que produce el aumento en la concentración de AOT en los espectros de emisión de fluorescencia de los fotosensibilizadores. Los resultados para TCP-C₆₀ y TCP-C₆₀⁴⁺ se muestran en la Figura N°25. Como puede observarse, el aumento en la concentración del surfactante produce un incremento en la intensidad de las bandas de emisión de ambas moléculas. Este efecto se atribuyó a la interacción entre las díadas y las micelas inversas de AOT. Por lo tanto, se calcularon las constantes de distribución (K_{AOT}) a partir del ajuste no lineal del gráfico de intensidad de emisión en función de la concentración molar de AOT, empleando la Ecuación N°12 (Figura N°25). Se obtuvo un valor de $K_{AOT}=63\pm10\text{ M}^{-1}$ para TCP-C₆₀ y de $K_{AOT}=432\pm36\text{ M}^{-1}$ para TCP-C₆₀⁴⁺. Estos resultados indican que ambos fotosensibilizadores se asociaron con las micelas inversas lo cual se puede atribuir en parte a su carácter anfifílico. La presencia de cargas positivas intrínsecas en la díada catiónica permite una mayor interacción con las micelas inversas de AOT, en comparación con su homólogo que contiene grupos amino sin carga.

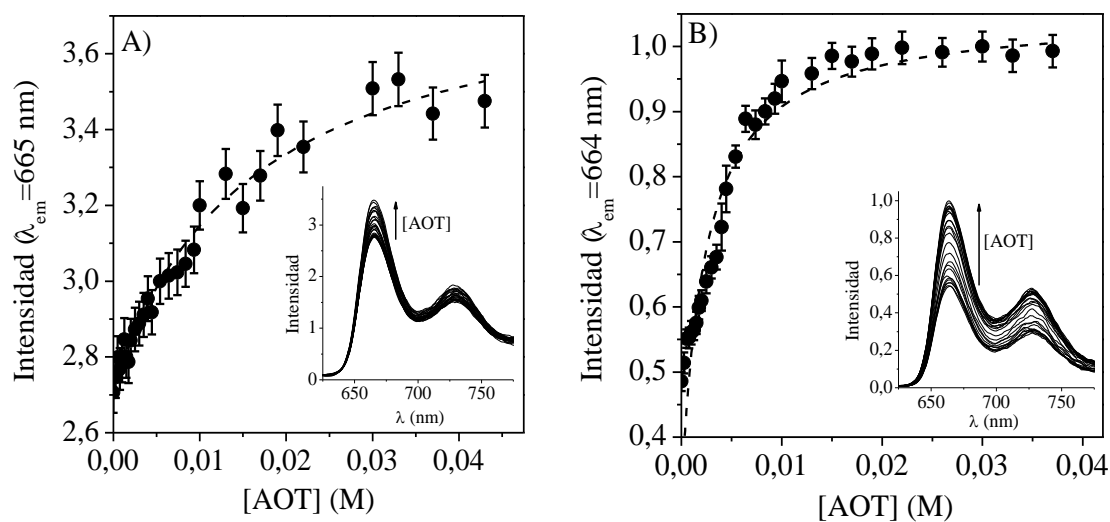


Figura N°25. Variación de la intensidad de emisión de fluorescencia como una función de la [AOT] en micelas inversas de tolueno/AOT (0,1 M)/agua ($W_0 = 10$) de (A) TCP-C₆₀ ($\lambda_{\text{máx}}=665\text{ nm}$) y B) TCP-C₆₀⁴⁺ ($\lambda_{\text{máx}} = 664\text{ nm}$), $\lambda_{\text{exc}}=432\text{ nm}$. Línea discontinua: ajuste no lineal con la Ecuación N°12. Gráficos insertados: espectros de emisión de fluorescencia de (A) TCP-C₆₀ y (B) TCP-C₆₀⁴⁺ a diferentes concentraciones de AOT (0,25-37,0 mM).

Cuando se usó el fotosensibilizador TCP no se observaron cambios espectroscópicos variando la concentración de AOT, lo que indica que esta porfirina permanece solubilizada principalmente en el solvente orgánico.

La fotooxidación de DMA inducida por TCP-C₆₀ y TCP-C₆₀⁴⁺ se estudió empleando como medio micelas inversas de tolueno/AOT (0,1 M)/agua (W₀=10) en condiciones aeróbicas. Debido a que el DMA es un compuesto no polar, se supone que este sustrato se solubiliza principalmente en la *pseudo* fase orgánica (tolueno) del sistema micelar.⁴²³⁻⁴²⁴ En este microambiente biomimético, el sustrato reacciona con el O₂(¹Δ_g) producido por las díadas, una vez formado su estado excitado triplete. A partir de gráficos característicos (Figura N°26) se calcularon los valores de k_{obs}^{DMA} para cada fotosensibilizador en el sistema micelar. Como se puede observar en la Tabla N°4, la fotooxidación del DMA por TCP-C₆₀ y TCP mostró la misma tendencia observada en tolueno. Sin embargo, las velocidades de descomposición del DMA por parte de estos fotosensibilizadores en el sistema micelar, es más lenta que la que se obtuvo en tolueno por un factor de ~2 (Tabla N°4). Esto se debe a que en el sistema biomimético, el O₂(¹Δ_g) se reparte entre las *pseudo* fases interna y externa.⁴²³ Por lo tanto, la tasa de fotooxidación del DMA está disminuida en comparación con un medio homogéneo. Un comportamiento similar se observó anteriormente en micelas inversas de AOT utilizando una porfirina unida covalentemente al antifúngico fluconazol como fotosensibilizador.⁸¹

Tabla N°4. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de DMA (k_{obs}^{AOT}) y rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) en micelas inversas de AOT.

Fotosensibilizador	TCP	TCP-C ₆₀	TCP-C ₆₀ ⁴⁺
k_{obs}^{AOT} (s ⁻¹)	(3,6±0,1)x10 ⁻⁵	(4,3±0,1)x10 ⁻⁵	(3,9±0,1)x10 ⁻⁵
Φ_{Δ}^{AOT}	0,42±0,02 ^a	0,50±0,02	0,46±0,02

^ausando TCP como referencia en tolueno.

La díada TCP-C₆₀⁴⁺ produce la descomposición de DMA de manera eficiente en la micela inversa de AOT en contraste con lo observado en tolueno o en DMF (Tabla N°3). Este comportamiento puede ser atribuido a dos efectos diferentes. En primer lugar, la díada catiónica está parcialmente agregada en tolueno. Así, las micelas inversas de AOT ayudan a desagregar la díada, lo que resulta en un aumento en la actividad fotodinámica. En segundo lugar, a pesar que este fotosensibilizador interactúa fuertemente con las micelas de AOT, debido al alto carácter lipófilo de la esfera del fullereno, se espera que TCP-C₆₀⁴⁺ se encuentre en la interfaz micelar con la estructura hidrofóbica del C₆₀ situado en el disolvente no polar. Si el C₆₀ se localiza en tolueno disminuye la formación de un estado de separación de carga favoreciendo la producción de O₂(¹Δ_g) a partir del estado excitado triplete del

fullereno. Los C_{60} poseen una muy baja solubilidad en solventes polares, tales como agua o metanol, y se solubilizan principalmente en tolueno y en disulfuro de carbono.⁴²⁵⁻⁴²⁶ Es por ello, que se considera que en la micela inversa de AOT, el fullereno está orientado hacia la *pseudo* fase orgánica. Además, estudios previos así lo confirman.¹⁹⁷

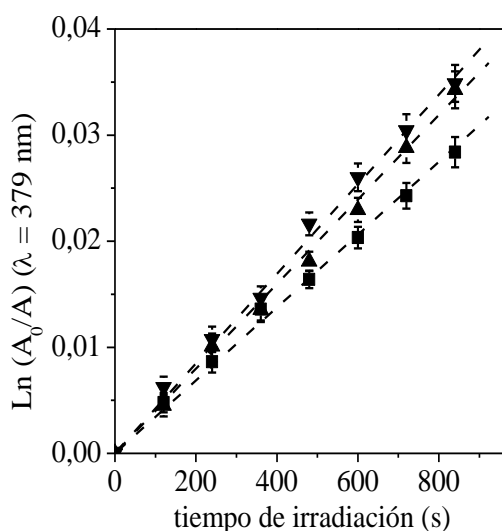


Figura N°26. Gráfico de primer orden para la fotooxidación de DMA (35 μ M) fotosensibilizada por TCP- C_{60} (▼), TCP- C_{60}^{4+} (▲) y TCP (■) en tolueno/AOT (0,1 M)/agua ($W_0 = 10$); $\lambda_{irr}=428\pm5$ nm.

Por otra parte, se calcularon los valores Φ_{Δ} de ambas díadas en micelas inversas de AOT utilizando como referencia la porfirina TCP, la cual se solubiliza principalmente en tolueno. Como se puede observar en la Tabla N°4, tanto la díada neutra como la catiónica actuaron como fotosensibilizadores eficaces para generar $O_2(^1\Delta_g)$ en este medio microheterogéneo. Estos resultados confirman el hecho que la capacidad fotodinámica de los fotosensibilizadores disminuye cuando están agregados en un medio en particular (sección 1.3.). Actualmente, se están empleando micelas poliméricas para el transporte de fotosensibilizadores, algunas de las cuales han obtenido recientemente su patente.⁴²⁷ Estas investigaciones surgen por la necesidad de desarrollar sistemas apropiados para el transporte y suministro de los fotosensibilizadores principalmente para la PDT.

En el año 2004 Scalise y col., emplearon micelas inversas de AOT como un medio biomimético para evaluar la actividad fotodinámica de distintos fotosensibilizadores anfifílicos para la terapia fotodinámica.²⁴⁷ Las moléculas estudiadas fueron la base libre 5-(4-carboxifenil)-10,15,20-tris(4-metilfenil)porfirina y la misma coordinada con distintos metales: Zn(II), Pd(II), Ni(II) y Cu(II). Como sustrato se empleó la enzima ureasa, la cual es desactivada por el $O_2(^1\Delta_g)$. Así, se estudió el efecto fotodinámico que las porfirinas ejercen sobre la ureasa en micelas inversas de AOT. Los autores encontraron que la fotoinactivación

de la enzima aumenta con el incremento en la producción de $O_2(^1\Delta_g)$. Sin embargo, los investigadores detectaron que la inactivación de la ureasa es menor en micelas inversas de AOT que en un medio homogéneo de THF.²⁴⁷

En el año 2007 Suchetti y col., estudiaron la monomerización y la actividad fotodinámica en micelas inversas de AOT de fotosensibilizadores catiónicos tetraalquiltetrapiridinoporfirazinium con sustituyentes *N*-alquilo de diferente longitud.⁴²⁴ Todas estas moléculas están coordinadas con Zn(II). Sus nombres son ZnPc1 que posee como sustituyente un grupo metilo, ZnPc2 que posee una cadena carbonada de 12 átomos de carbono $((CH_2)_{11}CH_3)$ y ZnPc3 que contiene como sustituyente una cadena larga de 16 átomos de carbono $((CH_2)_{15}CH_3)$. Estas moléculas son insolubles en agua y en *n*-heptano, sin embargo los autores encontraron que se monomerizan en micelas inversas.⁴²⁴ Es por ello, que decidieron evaluar la actividad fotodinámica en el sistema formado por *n*-heptano/AOT (0,1M)/agua ($W_0=30$) empleando DMA como sustrato para censar la producción de $O_2(^1\Delta_g)$. El sistema se irradió con luz monocromática ($\lambda_{irr}=670$ nm) en condiciones aeróbicas. Los rendimientos cuánticos de producción de $O_2(^1\Delta_g)$ siguen el orden ZnPc1>ZnPc2~ZnPc3. Por lo tanto, las micelas inversas de AOT permitieron desagregar los fotosensibilizadores y aumentar su actividad fotodinámica dado que en medio homogéneo las mismas no producían cantidades considerables de $O_2(^1\Delta_g)$.⁴²⁴

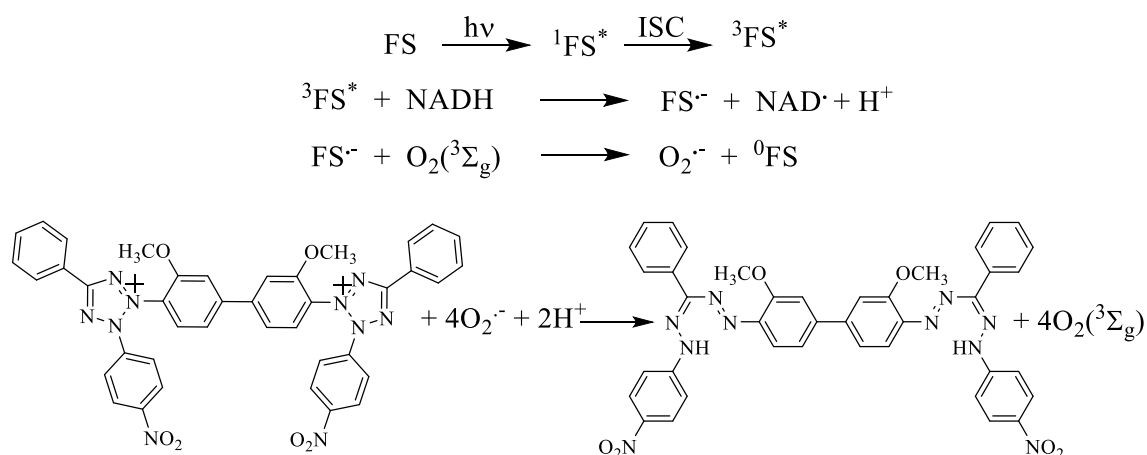
4.6. Determinación de $O_2^{\cdot-}$ con NBT

La historia de las sales de tetrazolio y formazans se remonta a 100 años atrás, cuando Friese hizo reaccionar nitrato de diazonio con nitrometano en benceno dando lugar al primer formazano.⁴²⁸ Diecinueve años más tarde, Von Pechmann y Runge oxidaron un formazán para producir la primera sal de tetrazolio.⁴²⁸ Cientos de sales de tetrazolio y formazán se prepararon en los años siguientes, pero sólo para algunas de ellas se han encontrado algunas aplicaciones fundamentalmente para investigaciones biológicas.

En este estudio se empleó un derivado de las sales de tetrazolio, el azul de nitrotetrazolio o NBT. Este se utilizó para la determinación de $O_2^{\cdot-}$ debido a que este radical reacciona con NBT para producir DF el cual presenta una banda de absorción a ~560 nm en DMF (Esquema N°62). De esta manera, la producción de $O_2^{\cdot-}$ puede determinarse a partir de los cambios en el espectro de absorción (Figura N°27A).²⁹⁴

Los fotosensibilizadores TCP, TCP- C_{60} y TCP- C_{60}^{4+} se estudiaron en DMF/ H_2O 1% en condiciones aeróbicas en presencia de NBT, irradiando las soluciones a 428 ± 5 nm. Los tres fotosensibilizadores producen radical anión superóxido. Sin embargo, las diádas

muestran un comportamiento muy similar mientras que la porfirina TCP es la que genera la mayor cantidad de $O_2^{\cdot-}$ (Figura N°27B). Posiblemente, debido a que en un solvente más polar como DMF, las porfirinas una vez que son iluminadas forman un estado excitado triplete y desde allí generan $O_2^{\cdot-}$, mientras que las díadas forman principalmente un estado de separación de carga fotoinducido. Por lo tanto, posiblemente se estén llevando a cabo dos reacciones fotoquímicas diferentes con distintas velocidades de reacción (cinéticas).



Esquema N°62. Formación del DF a partir de la reacción entre ${}^3\text{FS}^*$ y NADH, y entre el $\text{O}_2^{\cdot-}$ y NBT.

Experimentos control se realizaron en ausencia de NBT, NADH o del fotosensibilizador. En los dos primeros casos no hubo producción de $\text{O}_2^{\cdot-}$, mientras que cuando el fotosensibilizador está ausente en el medio de reacción, pero están presentes NBT y NADH, se genera una cantidad mínima de este radical (Figura N°27B). Por lo tanto, esta metodología no permite diferenciar si el $\text{O}_2^{\cdot-}$ se forma a partir del estado excitado triplete del fotosensibilizador o desde el estado de separación de cargas fotoinducido en la díada. En todos los casos, la presencia de NADH es indispensable para la formación de DF y permite observar el cambio de color característico del medio de reacción de amarillo a violeta. Estos resultados nos indican que existe un aporte significativo del mecanismo tipo I en presencia NADH a la acción fotodinámica por parte de todos los fotosensibilizadores estudiados. Sin embargo, en un medio biológico, dependiendo del microentorno celular dónde se localice el fotosensibilizador y de la presencia de sustratos, se pueden producir modificaciones en las propiedades observadas en solución.

En un trabajo previo, se detectó la formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ por parte de un derivado del fullereno C_{60} dicatiónico en presencia de NBT y NADH.¹⁶¹ El estudio se llevó a cabo en micelas inversas formadas por cloruro de bencilhexadecildimetilamonio, una molécula anfifílica catiónica. El sistema que se ensayó estaba compuesto por benceno/BHDC (0,1

M)/agua ($W_0=10$). La solución se irradió con luz visible durante diferentes períodos de tiempo.¹⁶¹ Estos resultados ponen en evidencia que los derivados del C_{60} , son fotosensibilizadores eficientes para la producción de $O_2^{\bullet-}$, una de las especies reactivas de oxígeno implicada en el mecanismo de acción fotodinámico tipo I. Por otro lado Ferreyra y col., emplearon mezclas de NBT y NADH para detectar la producción de $O_2^{\bullet-}$ por parte de la porfirina TCP.¹⁶² Los autores encontraron que cuando la solución se irradia con luz visible, la descomposición de NBT se incrementa considerablemente en presencia de TCP, en comparación con la solución en ausencia del fotosensibilizador. Por lo tanto, aunque se genere una cantidad considerable de $O_2(^1\Delta_g)$ a partir del estado excitado triplete de la porfirina, también se puede producir $O_2^{\bullet-}$ en presencia de NADH.¹⁶²

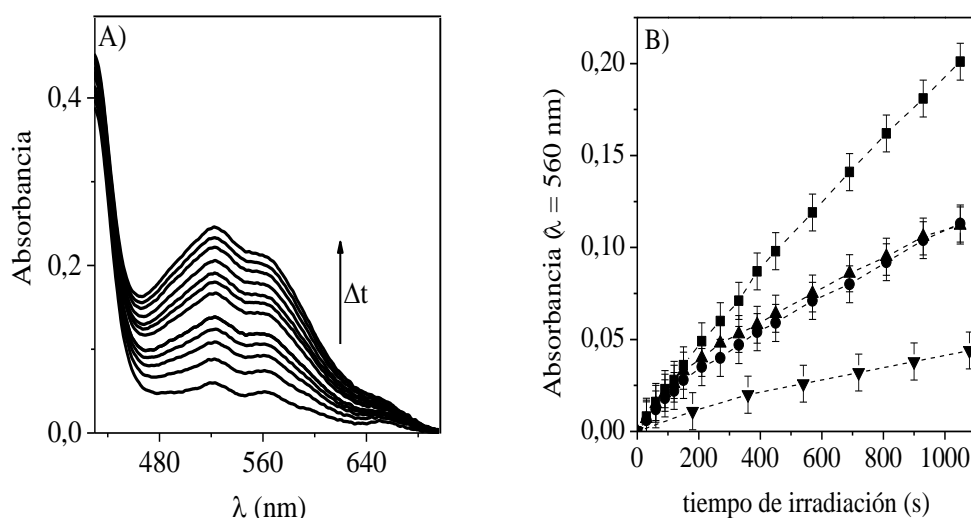
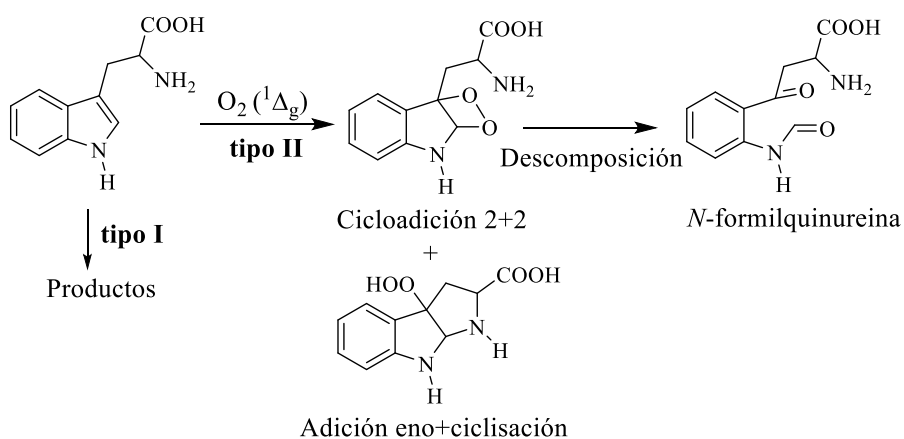


Figura N°27. (A) Aumento de la absorbancia a medida que transcurre el tiempo de irradiación debido a la aparición del producto diformazán. TCP + NBT + NADH en DMF. (B) Detección de $O_2^{\bullet-}$ mediante la reacción con NBT a diferentes tiempos de irradiación con luz monocromática. NBT + NADH (▼), TCP + NBT + NADH (■), TCP- C_{60} + NBT + NADH (●) y TCP- C_{60}^{4+} + NBT + NADH (▲). Estudios en DMF a $\lambda_{irr}=428\pm 5$ nm.

4.7. Fotooxidación de Trp

El Trp se utilizó para analizar la eficiencia de los agentes fotosensibilizadores debido a que puede ser descompuesto por un mecanismo tipo I o tipo II (Esquema N°63).^{243, 429} Este aminoácido, puede ser una de las moléculas objetivo en tratamientos de PDI inducidos por porfirinas debido a que es susceptible a ser modificado por la presencia de agentes oxidantes.⁴³⁰ Las modificaciones en la estructura del aminoácido pueden causar alteraciones significativas en las propiedades fisicoquímicas de las proteínas y subsecuentemente dar lugar a un daño celular.⁴³¹



Esquema N°63. Reacciones de tipo I y tipo II para Trp.

El efecto fotodinámico se analizó siguiendo la descomposición del aminoácido a través de la disminución en su emisión de fluorescencia a 340 nm en DMF. Esta reacción sigue una cinética de *pseudo* primer orden con respecto a la concentración de Trp (Figura N°28). A partir del ajuste lineal de gráficos de $\ln(I_0/I)$ en función del tiempo, se calcularon los valores de k_{obs}^{Trp} para la descomposición de Trp fotosensibilizada por la porfirina TCP y por las díadas TCP- C_{60} y TCP- C_{60}^{4+} .

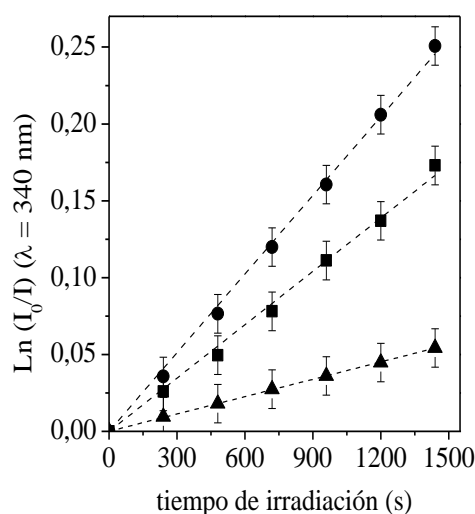


Figura N°28. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de Trp (20 μ M) fotosensibilizada por TCP (●), TCP- C_{60}^{4+} (■) y TCP- C_{60} (▲) en DMF ($\lambda_{irr}=428\pm5$ nm).

Comparando los valores de k_{obs}^{Trp} , se encontró que para la fotodescomposición en presencia de TCP- C_{60} se obtiene un valor de k_{obs}^{Trp} menor que para TCP y TCP- C_{60}^{4+} (Tabla N°5). El fotosensibilizador TCP presenta una actividad fotodinámica considerable en DMF porque posee un aporte significativo del mecanismo tipo II (Φ_{Δ}^{DMF} , Tabla N°3). Debido a que la díada TCP- C_{60} produce muy poco $O_2(^1\Delta_g)$ (Φ_{Δ}^{DMF} , Tabla N°3), es posible que la fotooxidación del sustrato se deba principalmente al mecanismo de acción tipo I. La

producción de $O_2(^1\Delta_g)$ inducido por la díada catiónica TCP-C₆₀⁴⁺ es considerablemente baja en DMF, sin embargo, se observó que esta díada descompone eficientemente al aminoácido (Figura N°28). Esto se debe a que los fotosensibilizadores catiónicos pueden interaccionar electrostáticamente con el sustrato Trp, aumentando la descomposición del aminoácido principalmente mediante un mecanismo tipo I.¹⁹³

Tabla N°5. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de Trp (k_{obs}^{Trp}).

Fotosensibilizador	TCP	TCP-C ₆₀	TCP-C ₆₀ ⁴⁺
$k_{obs}^{DMF} (s^{-1})^a$	$(1,71\pm0,02)\times10^{-4}$	$(3,76\pm0,02)\times10^{-5}$	$(1,16\pm0,02)\times10^{-4}$
$k_{obs}^{DMF} (s^{-1})^{b,c}$	$(3,36\pm0,05)\times10^{-4}$	$(1,15\pm0,06)\times10^{-4}$	$(1,7\pm0,2)\times10^{-4}$
$k_{obs}^{DMF} (s^{-1})$ con 5.6 μM β-caroteno ^{b,c}	$(2,25\pm0,06)\times10^{-4}$	$(1,13\pm0,06)\times10^{-4}$	$(1,6\pm0,2)\times10^{-4}$
$k_{obs}^{DMF} (s^{-1})^{b,d}$	$(8,0\pm0,4)\times10^{-5}$	$(3,2\pm0,2)\times10^{-5}$	$(7,5\pm0,2)\times10^{-5}$
$k_{obs}^{DMF} (s^{-1})$ con 50 mM azida ^{b,d}	$(3,8\pm0,2)\times10^{-5}$	$(2,9\pm0,2)\times10^{-5}$	$(5,5\pm0,2)\times10^{-5}$
$k_{obs}^{DMF} (s^{-1})^{b,e}$	$(6,5\pm0,2)\times10^{-5}$	$(2,6\pm0,2)\times10^{-5}$	$(3,7\pm0,2)\times10^{-5}$
$k_{obs}^{DMF} (s^{-1})$ con 50 mM manitol ^{b,e}	$(6,4\pm0,2)\times10^{-5}$	NR	$(3,6\pm0,2)\times10^{-5}$

^a $\lambda_{irr}=428\pm5$ nm; ^b $\lambda_{irr}=562\pm5$ nm; ^c 100% DMF; ^d DMF/H₂O 2,5%; ^e DMF/ H₂O 5%

Debido a que la fotooxidación de DMA y Trp, fotosensibilizada por TCP, se estudió en el mismo solvente (DMF) y se empleó la misma fuente de irradiación ($\lambda_{irr}=428\pm5$ nm), se pudo determinar el valor de la constante de velocidad de reacción para el Trp. A partir de las Ecuaciones N°3 y N°8, se puede escribir la ecuación N°15:

$$\frac{k_{obs}^{DMA}}{k_{obs}^{Trp}} = \frac{k_r^{DMA}[O_2(^1\Delta_g)]}{k_r^{Trp}[O_2(^1\Delta_g)]} \quad (15)$$

Por lo tanto, simplificando y despejando el término k_r^{Trp} se obtiene:

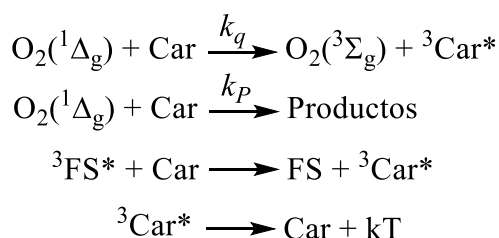
$$k_r^{Trp} = \frac{k_{obs}^{Trp} k_r^{DMA}}{k_{obs}^{DMA}} \quad (16)$$

Teniendo en cuenta que $k_r^{DMA}=5\times10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ⁴³² se obtuvo que $k_r^{Trp}=(6,2\pm0,2)\times10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Este valor es similar al encontrado para la fotooxidación de Trp mediada por $O_2(^1\Delta_g)$ en HCONH₂/D₂O (90:10, $k_r^{Trp}=8,7\times10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) o en metanol/H₂O (50:50, $k_r^{Trp}=7,0\times10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

¹).⁴³³ Por lo tanto, la descomposición de Trp inducida por TCP es principalmente producida por un fotoproceso tipo II.

4.7.1. Fotooxidación de Trp en presencia de β -caroteno

El efecto fotodinámico se estudió siguiendo la fotodescomposición del aminoácido Trp en presencia de β -caroteno (Car), a partir de la disminución en la emisión de fluorescencia a 340 nm. Se irradiaron con luz monocromática ($\lambda_{irr}=562\pm5$ nm, longitud de onda a la cual la especie que absorbe es principalmente el fotosensibilizador, Figura N°29) soluciones en DMF del fotosensibilizador con Trp y con el agregado de caroteno. En estas condiciones, el caroteno puede desactivar al $O_2(^1\Delta_g)$ a través de la transferencia de energía o por una reacción química (Esquema N°64).⁴³⁴



Esquema N°64. Desactivación del $O_2(^1\Delta_g)$ y del estado excitado triplete del fotosensibilizador por el caroteno.

A partir de los gráficos obtenidos (Figura N°30), se calcularon los valores de k_{obs}^{Trp} para la descomposición del sustrato, en presencia y en ausencia de caroteno, fotosensibilizada por la porfirina TCP y por las díadas TCP-C₆₀ y TCP-C₆₀⁴⁺.

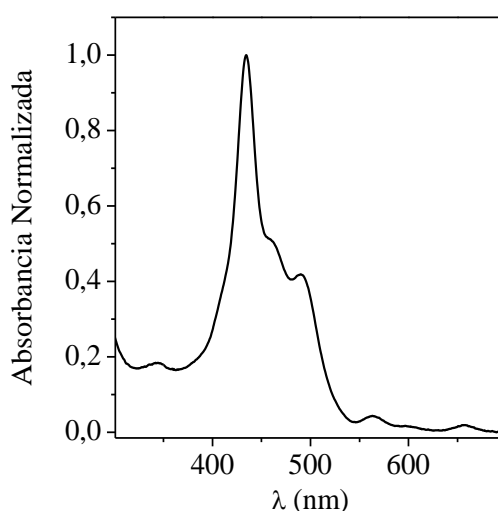


Figura N°29. Espectro de absorción de β -caroteno y TCP en DMF.

Los valores de las constantes de velocidad observadas, en ausencia (k_{obs}^{Trp}) y presencia de caroteno ($k_{obs}^{Trp+Car}$), se obtuvieron a partir del ajuste lineal de un gráfico de $\ln(I_0/I)$ vs. tiempo (Figura N°30). Los resultados se resumen en la Tabla N°5. Como se observa en la Figura N°30, para la fotodescomposición de Trp fotosensibilizada por TCP en presencia de caroteno, se encontró un valor de k_{obs}^{Trp} menor al que se obtiene cuando el mismo está ausente. La porfirina TCP genera principalmente $O_2(^1\Delta_g)$ (Φ_{Δ}^{DMF} , Tabla N°3) por lo que al agregar un atrapador de tal especie, ejerce un efecto fotoprotector, y la descomposición del Trp disminuye. Por otro lado, en presencia del fotosensibilizador TCP-C₆₀ los valores de k_{obs}^{Trp} no se vieron afectados por el agregado de caroteno (Tabla N°5). Cuando la díada se encuentra disuelta en un solvente polar, como DMF, se ve favorecido el estado de separación de carga fotoinducido disminuyendo su capacidad para generar $O_2(^1\Delta_g)$ (Φ_{Δ}^{DMF} , Tabla N°3). Para TCP-C₆₀⁴⁺ se observa un comportamiento similar que para TCP-C₆₀, el valor de la k_{obs}^{Trp} prácticamente no cambia con el agregado de caroteno. En estas condiciones, la fotooxidación de Trp se inactivó con una eficiencia de $\sim 0,33$ ($\eta_q = 1 - k_{obs}^{Trp+Car}/k_{obs}^{Trp}$)³⁸⁵ para TCP, $\sim 0,02$ para TCP-C₆₀ y de $\sim 0,06$ para TCP-C₆₀⁴⁺. Por lo tanto, los resultados para ambas díadas concuerdan con la muy baja producción de $O_2(^1\Delta_g)$ en DMF (Φ_{Δ}^{DMF} , Tabla N°3).

Con los valores determinados de $k_{obs}^{Trp+Car}$ y k_{obs}^{Trp} para TCP, se pudo calcular la constante de Stern-Volmer (K_{SV}) a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{k_{obs}^{Trp}}{k_{obs}^{Trp+Car}} = 1 + K_{SV}[Car] = 1 + \tau_0 k_q [Car] \quad (17)$$

donde k_q representa la constante de *quenching* y τ_0 el tiempo de vida del $O_2(^1\Delta_g)$ en ausencia de caroteno. Se encontró un valor de $K_{SV} = (3,6 \pm 0,2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ el cual está de acuerdo con resultados previamente publicados por Milanese y col., quienes emplearon el fotosensibilizador 5-[4-(trimetilamonio)fenil]-10,15,20-tris(2,4,6-trimetoxifenil)porfirina para determinar el valor de K_{SV} empleando la misma metodología descrita en esta tesis.³⁸⁵ Considerando que $\tau_0 = 20 \text{ } \mu\text{s}$ en DMF,³⁰² se determinó un valor de $k_q = 1,8 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. En estudios previos se determinó un valor $k_r = 2,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la constante de reacción de Car en DMF.³⁸⁵ Por lo tanto, la función fotoprotectora del Car es altamente efectiva debido a que la constante de reacción química (k_r) es varios órdenes de magnitud más baja que la desactivación física (k_q).⁴³⁴

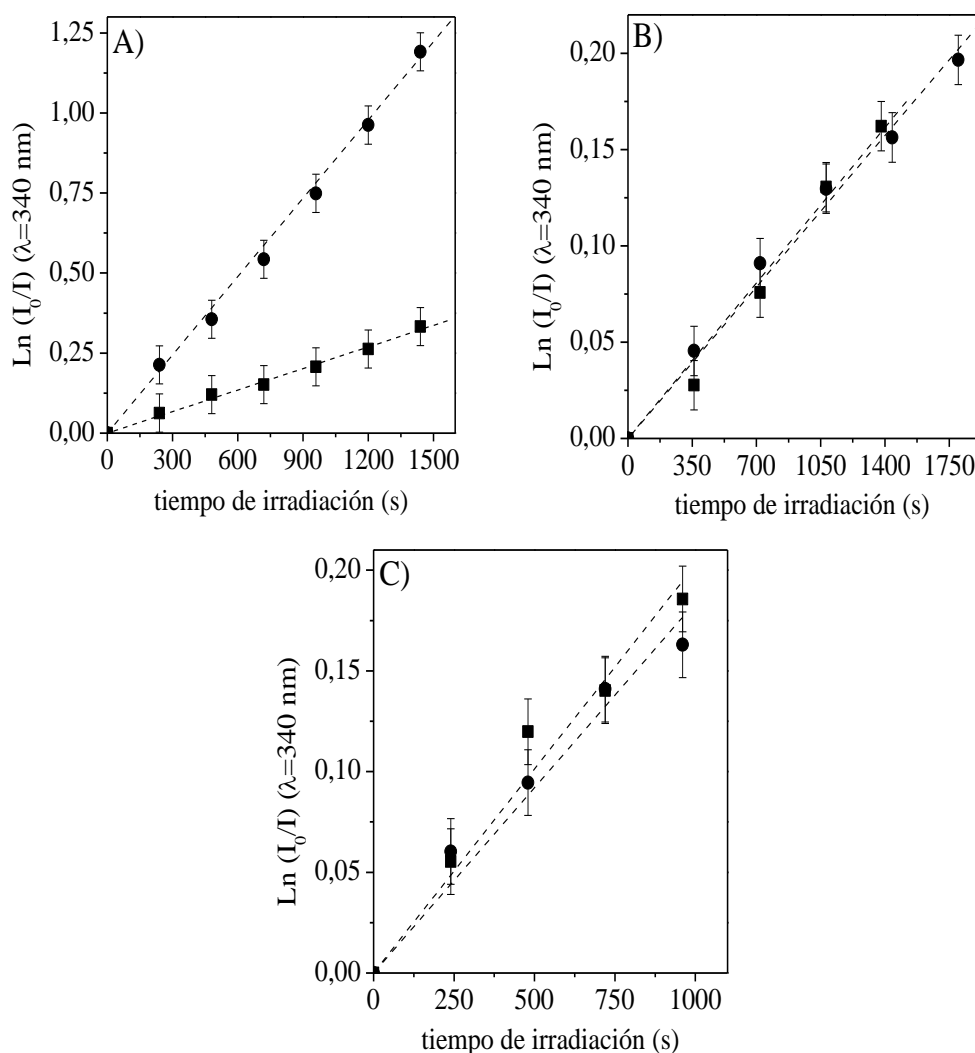
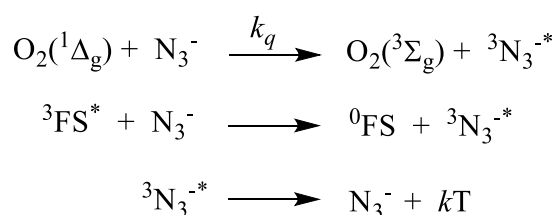


Figura N°30. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de Trp (20 μM) fotosensibilizada por (A) TCP + β-caroteno (■) y TCP (●) B) TCP-C₆₀ + β-caroteno (■) y TCP-C₆₀ (●) C) TCP-C₆₀⁴⁺ + β-caroteno (■) y TCP-C₆₀⁴⁺ (●) (λ_{irr}=562±5 nm) en DMF.

4.7.2. Fotooxidación de Trp en presencia del ion azida

La fotooxidación de Trp se estudió en presencia del ion azida en DMF con un 2,5% de H₂O. Este ion puede desactivar al O₂(¹Δ_g) y a otros compuestos en su estado excitado triplete, a través de una transferencia de energía (Esquema N°65).⁴³⁵ El ion azida es soluble en agua y desactiva al O₂(¹Δ_g) por *quenching* físico, con una constante de velocidad de *quenching* $k_q=5 \times 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$.⁴³⁶



Esquema N°65. Desactivación del O₂(¹Δ_g) y del estado excitado triplete del fotosensibilizador por el ion azida.

A partir del ajuste lineal de gráficos de $\ln(I_0/I)$ en función del tiempo (Figura N°31), se calcularon las k_{obs}^{Trp} para la descomposición del sustrato, en presencia y en ausencia de azida, fotosensibilizada por la porfirina TCP y las díadas TCP-C₆₀ y TCP-C₆₀⁴⁺.

Como se observa en la Figura N°31, para la fotodescomposición de Trp fotosensibilizada por TCP en presencia del ion azida, se encontró un valor de k_{obs}^{Trp} menor al que se obtiene cuando el mismo está ausente (Tabla N°5). La porfirina TCP genera principalmente $O_2(^1\Delta_g)$ por lo que al agregar un atrapador de tal especie, ejerce un efecto fotoprotector y la descomposición del Trp disminuye. Por otro lado, en presencia de la díada TCP-C₆₀ se obtuvo un valor de k_{obs}^{Trp} similar en ausencia y en presencia de azida, lo que estaría indicando que este fotosensibilizador oxida al sustrato Trp principalmente por un mecanismo de acción tipo I. Cataño y col. demostraron, que la fotooxidación de residuos de aminoácidos en péptidos ocurre mediante un mecanismo fotoquímico tipo I.⁴³⁷ Los autores emplearon pterinas como fotosensibilizadores. Estos son compuestos heterocíclicos formados por un sistema de anillos pteridina, con un grupo cetona y un grupo amina en las posiciones 4 y 2, respectivamente. Todos los estudios los llevaron a cabo en soluciones acuosas con un pH=5,5. El sistema se irradió con luz ultravioleta dado que en este rango de longitudes de onda, los aminoácidos que conforman a los péptidos no absorben. El análisis del mecanismo de acción señala que en este sistema la generación de $O_2(^1\Delta_g)$ es despreciable.⁴³⁸ Así, la reacción dominante es iniciada por una transferencia de electrones desde el Trp al estado excitado triplete del fotosensibilizador. La posterior transferencia de energía da lugar a $O_2^{\bullet-}$ que luego va a dar como producto H_2O_2 .⁴³⁸

Finalmente, para la fotodescomposición de Trp fotosensibilizada por la díada TCP-C₆₀⁴⁺ en presencia del ion azida se encontró un valor de k_{obs}^{Trp} similar en ausencia y en presencia del atrapador. Tanto el anión azida como el Trp interactúan electrostáticamente con el fotosensibilizador cargado positivamente.¹⁹³ Por lo tanto, N_3^- y Trp compiten por interaccionar con el fotosensibilizador disminuyendo la interacción entre el Trp y el fotosensibilizador. Este efecto puede reducir la fotooxidación del sustrato. Es por ello, que en este caso no se puede afirmar que el anión azida actúa estrictamente como un atrapador de $O_2(^1\Delta_g)$.

Además, la desactivación del estado excitado triplete del fotosensibilizador en la díada por el ion azida no puede competir con la transferencia de carga fotoinducida, la cual es un proceso intramolecular rápido que puede provenir desde el estado excitado singlete de la porfirina.⁴³⁹

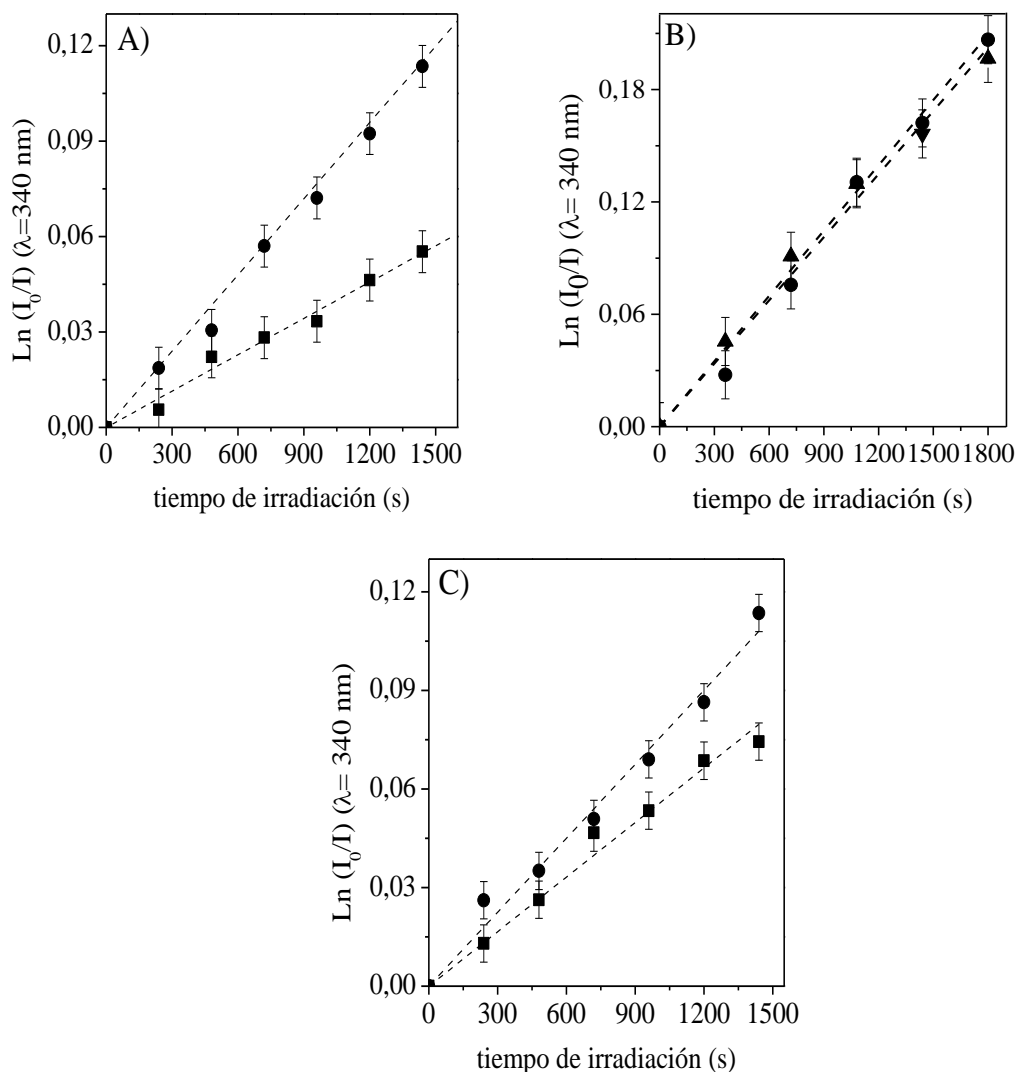
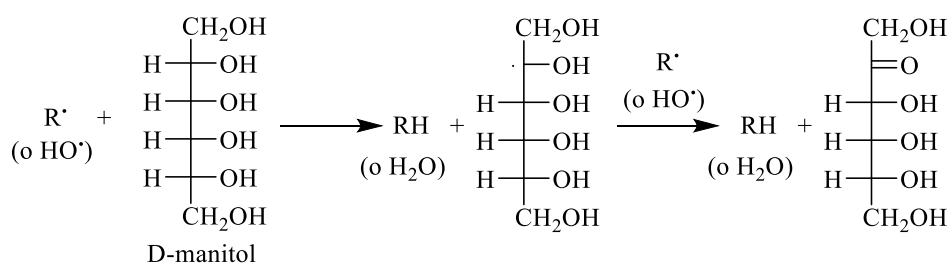


Figura N°31. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de Trp (20 μ M) fotosensibilizada por: (A) TCP + azida (■) y TCP (●) (B) TCP-C₆₀ + azida (■) y TCP-C₆₀ (●) C) TCP-C₆₀⁴⁺ + azida (■) y TCP-C₆₀⁴⁺ (●) ($\lambda_{irr}=562 \pm 5$ nm) en DMF.

4.7.3. Fotooxidación de Trp en presencia de D-manitol

La fotooxidación de Trp por los fotosensibilizadores se estudió en presencia de D-manitol en DMF con un 5% de H₂O. Este compuesto actúa como un atrapador de radicales (Esquema N°66). Por lo tanto, se empleó para verificar la presencia del mecanismo de fotorreacción tipo I.⁴⁴⁰



Esquema N°66. Desactivación de los radicales libres R[•] y HO[•] por manitol.

A partir del ajuste lineal de gráficos de $\ln(I_0/I)$ en función del tiempo (Figura N°32), se calcularon los valores de k_{obs}^{Trp} para la descomposición del sustrato, en presencia y en ausencia de manitol, fotosensibilizada por la porfirina TCP y las díadas TCP- C_{60} y TCP- C_{60}^{4+} . Los resultados se muestran en la Tabla N°5.

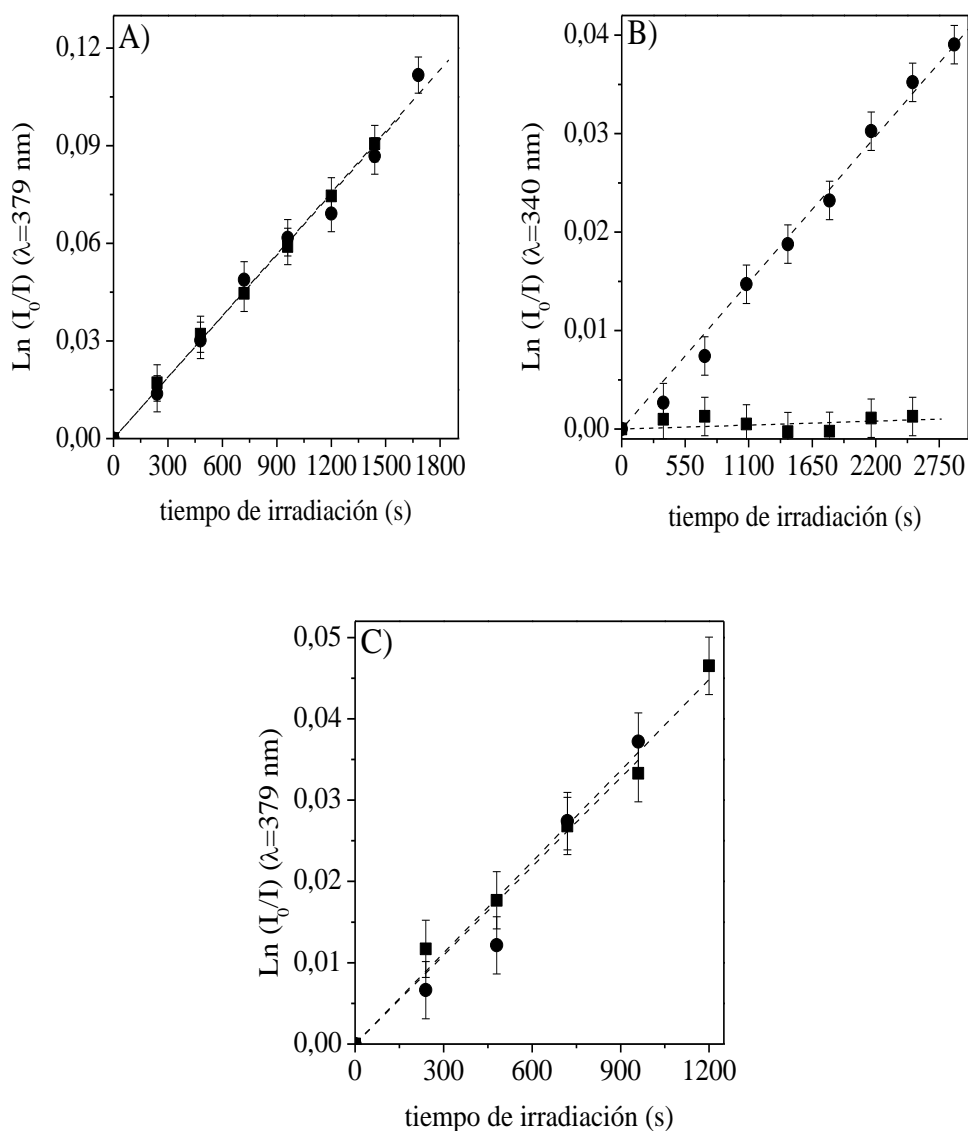


Figura N°32. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de Trp (20 μ M) fotosensibilizada por (A) TCP + D-manitol (■) y TCP (●) (B) TCP- C_{60} + D-manitol (■) y TCP- C_{60} (●) C) TCP- C_{60}^{4+} + D-manitol (■) y TCP- C_{60}^{4+} (●) ($\lambda_{irr}=562\pm 5$ nm) en DMF.

Como se observa en la Figura N°32, para la fotodescomposición de Trp fotosensibilizada por TCP- C_{60} en presencia de manitol, se encontró un valor de k_{obs}^{Trp} mucho menor a la que se obtiene cuando el mismo está ausente. Cuando la díada se encuentra disuelta en un solvente polar, como DMF, se ve favorecido el estado de separación de carga fotoinducido disminuyendo su capacidad para generar $O_2(^1\Delta_g)$ (Φ_{Δ}^{DMF} , Tabla N°3). Por lo tanto, con el agregado de manitol se verifica que su principal mecanismo de acción es el tipo

I en estas condiciones. Por otro lado, en presencia del fotosensibilizador TCP el valor de k_{obs}^{Trp} no se modificó por el agregado de manitol, lo que pone de manifiesto que esta molécula genera principalmente $O_2(^1\Delta_g)$. En el caso de la díada TCP-C₆₀⁴⁺, la presencia de manitol prácticamente no afecta la velocidad de fotooxidación de Trp. Como se indicó anteriormente los fotosensibilizadores catiónicos pueden interaccionar con el Trp y producir la descomposición del aminoácido por un proceso radicalario de transferencia de carga fotoinducido.⁴⁴¹ Por lo tanto, la díada cargada positivamente interacciona electrostáticamente con el Trp y no siente la presencia del manitol neutro. Es así como el valor de k_{obs}^{Trp} no se modificó por el agregado de manitol.

4.8. Fotoinactivación de *S. aureus*

La inactivación fotodinámica de *S. aureus* inducida por los fotosensibilizadores TCP-C₆₀ y TCP-C₆₀⁴⁺ se comparó *in vitro*. Esta bacteria posee una pared celular permeable que permite la difusión de agentes como mecanismo de defensa, por lo que puede ser inactivada tanto por fotosensibilizadores catiónicos como neutros.¹²⁸ Este microorganismo se seleccionó debido a que es uno de los principales responsable de las infecciones intrahospitalarias (sección 1.1.3.).^{39-40, 442}

Suspensiones de *S. aureus* en PBS se trataron con una concentración de fotosensibilizador de 1 y 5 μ M durante 30 min en la oscuridad a 37 °C y los cultivos se irradiaron con luz visible. La Figura N°33 muestra la supervivencia de las células bacterianas después de diferentes tiempos de irradiación (5, 15 y 30 min). Los experimentos control ponen de manifiesto que la viabilidad celular no se vio afectada por la iluminación de las suspensiones celulares en ausencia del fotosensibilizador ni por la incubación en la oscuridad con los mismos durante 30 min. Por lo tanto, la inactivación celular observada después de la irradiación de los cultivos tratados, se debe a la PDI de los agentes fotosensibilizadores. Dada la naturaleza multi-cromóforo de las díadas, se puede esperar que los resultados cambien en función de cuál sea la molécula excitada. En este estudio, los cultivos se irradiaron con luz visible por lo tanto, ambos cromóforos pueden ser excitados.

La fotoinactivación de células de *S. aureus* depende de la concentración de díada empleada y de los tiempos de irradiación. Como se observa en la Figura N°33, las células de *S. aureus* se inactivan cuando los cultivos incubados con las díadas son expuestos a la luz visible. La suspensión bacteriana que se trató con una concentración de TCP-C₆₀ de 1 μ M durante 30 min de irradiación produjo una reducción de 2 log en la viabilidad celular, mientras que una concentración de 5 μ M dio lugar a una reducción de 3,2 unidades

C_{60}^{4+} . A ambas concentraciones, los resultados de la díada difieren significativamente de los compuestos de referencia ($p < 0,05$). Por lo tanto, la fotoinactivación de *S. aureus* inducida por TCP- C_{60}^{4+} resultó más alta que los restos catiónicos que la conforman, representados por DAC_{60}^{+} y TCP^{4+} . Por lo tanto, las díadas son moléculas muy prometedoras para ser empleadas en la PDI de microorganismos.

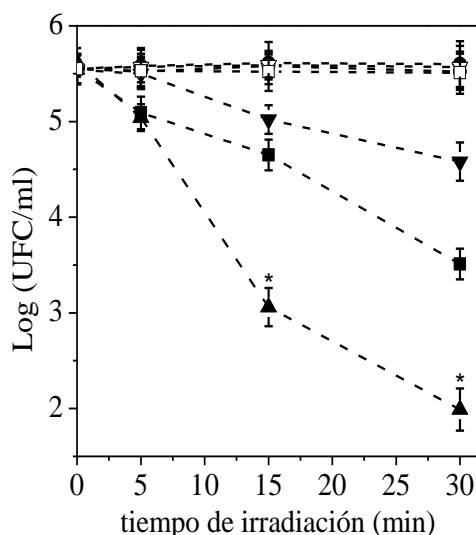


Figura N°34. Supervivencia de *S. aureus* ($\sim 10^6$ UFC/ml) incubada con $1 \mu M$ DAC_{60}^{+} (▼), TCP^{4+} (■) and $TCP-C_{60}^{4+}$ (▲) durante 30 min a $37^\circ C$ en la oscuridad e irradiadas con luz visible durante diferentes tiempos. Controles: células tratadas con $1 \mu M$ DAC_{60}^{+} (▽), TCP^{4+} (□) y $TCP-C_{60}^{4+}$ (△) en la oscuridad; células sin fotosensibilizador e irradiadas (●) (* $p < 0,05$, comparado con DAC_{60}^{+} o TCP^{4+}).

Comparaciones directas con otros fotosensibilizadores ya descriptos, son difíciles de realizar debido principalmente a diferencias en cuanto a la densidad celular y a los sistemas de irradiación utilizados. Estudios previos con *S. aureus* mostraron que la fotoinactivación es dependiente de la dosis de 5,10,15,20-tetrakis(4-*N,N,N*-trimetilamoniofenil)porfirina ($TMAP^{4+}$) y 5,10,15,20-tetrakis(4-*N*-metilpiridil)porfirina ($TMPyP^{4+}$) empleada.⁴⁴³⁻⁴⁴⁴ A una concentración de $1 \mu M$ ambas porfirinas son poco eficaces para inactivar 10^8 UFC/ml después de la exposición a la luz durante 30 min emitida por una lámpara de 500 W de tungsteno-halógeno. Cuando las células se trataron con $4 \mu M$ de porfirina, $TMPyP^{4+}$ causó una reducción de 1 log, mientras que $TMAP^{4+}$ produjo una disminución de 3 log en la supervivencia celular, por lo que demuestra ser más eficaz contra *S. aureus* que $TMPyP^{4+}$. Por otra parte, la muerte de los microorganismos inducida por una serie de derivados del fullereno C_{60} se comparó con la ocasionada por un fotosensibilizador antimicrobiano ampliamente utilizado, el azul de toluidina (TBO).²¹⁰ En particular, un fullereno C_{60} monocatiónico teniendo un grupo pirrolidinio cuaternario (BF_4), produjo una reducción de ~ 3 log en la viabilidad de *S. aureus* después del tratamiento con $1 \mu M$ de BF_4 y con una

dosis de luz visible de 8 J cm^{-2} (200 mW cm^{-2}), mientras que el TBO en las mismas condiciones produjo una disminución menor a 1 log.

Con el fin de obtener información acerca de la eficiencia de la díada TCP-C₆₀⁴⁺ para inactivar una bacteria Gram negativa, se realizaron experimentos de inactivación fotodinámica empleando el microorganismo *E. coli*. De esta manera, suspensiones celulares de esta bacteria se trataron con la díada catiónica de la misma manera que se empleó para *S. aureus*. El fotosensibilizador no mostró ser tóxico en la oscuridad incluso a la concentración más alta utilizada ($5 \text{ }\mu\text{M}$). Después de 30 min de irradiación con luz visible el medio celular tratado con 1 y $5 \text{ }\mu\text{M}$ de la díada TCP-C₆₀⁴⁺, presentó una disminución de 0,6 log y 1,7 log, respectivamente. Es conocido que las bacterias Gram positivas son más fáciles de inactivar empleando la PDI que las Gram negativas.¹⁷ Esto se debe principalmente a que la membrana externa de las bacterias Gram negativas es una barrera de permeabilidad efectiva entre la célula y el medio circundante, que tiende a restringir la unión y la penetración de muchos fotosensibilizadores (sección 1.2.1.).^{72, 114}

La combinación de sustituyentes hidrofóbicos e hidrofílicos en el fotosensibilizador permite obtener una estructura molecular anfifílica. Esta propiedad facilita la penetración de la membrana y resulta en una mejor acumulación del agente intracelularmente.⁷⁵ En la díada TCP-C₆₀⁴⁺, la presencia de grupos catiónicos y de la esfera de carbono hidrofóbica del C₆₀ en la misma estructura del fotosensibilizador, produce un aumento considerable en su carácter anfifílico. Este efecto podría ayudar a las díadas a atravesar o a acumularse en las biomembranas, mejorando su capacidad para inactivar *S. aureus*.

4.9. Mecanismo de acción fotodinámica *in vitro*

Con el fin de obtener información acerca del principal mecanismo de fotorreacción involucrado en la inactivación de *S. aureus* se realizaron una serie de experimentos en diferentes condiciones, tales como una atmósfera de argón, suspensiones celulares en D₂O y la adición del ion azida o de manitol. En todos los ensayos se empleó una concentración de TCP-C₆₀ y TCP-C₆₀⁴⁺ de $1 \text{ }\mu\text{M}$ y se irradiaron los cultivos durante 15 min. Durante este tiempo de iluminación se produce una reducción de ~2,5 log para ambas díadas, lo que permite ver una disminución o un aumento en la PDI al cambiar las condiciones del experimento.

4.9.1. PDI en una atmósfera anóxica

Se irradiaron suspensiones celulares de *S. aureus* tratadas con TCP-C₆₀ y TCP-C₆₀⁴⁺ en una atmósfera de argón. Este experimento se utilizó para evaluar la importancia de la presencia del oxígeno en la inactivación fotodinámica y para determinar la capacidad que posee la diáda de actuar en condiciones anóxicas. Las suspensiones tratadas con los dos fotosensibilizadores bajo estas condiciones y mantenidas en la oscuridad por 30 min, no se vieron afectadas (Figura N°35 y Figura N°36, columna 5). Por otro lado, se observó que la pérdida de viabilidad es altamente dependiente del oxígeno atmosférico dado que no hubo inactivación en ausencia del mismo (Figura N°35 y Figura N°36, columna 6).

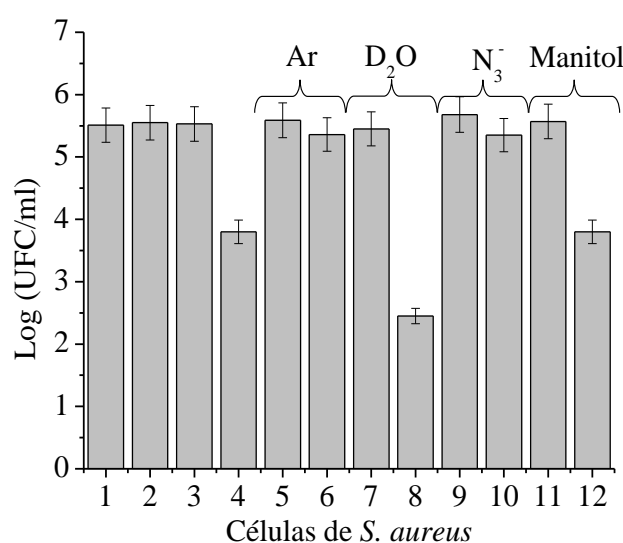


Figura N°35. Sobrevivencia de *S. aureus* ($\sim 10^6$ UFC/ml) incubadas con 1 μ M de TCP-C₆₀ en la oscuridad durante 30 min a 37°C y posterior irradiación con luz visible durante 15 min. (1) control oscuridad; (2) control irradiado; (3) control oscuridad con TCP-C₆₀; (4) células tratadas con TCP-C₆₀ e irradiadas; (5) control en atmósfera de argón; (6) células tratadas con TCP-C₆₀ e irradiadas en atmósfera de argón; (7) control de D₂O; (8) suspensión celular en D₂O tratada con TCP-C₆₀ e irradiada; (9) Control con 50 mM de NaN₃; (10) suspensión celular con NaN₃ tratada con TCP-C₆₀ e irradiada; (11) Control con 50 mM de manitol; (12) suspensión celular con manitol tratada con TCP-C₆₀ e irradiada.

Los resultados muestran que el efecto fotocitotóxico inducido por TCP-C₆₀ y TCP-C₆₀⁴⁺ es insignificante en condiciones anóxicas. La presencia del oxígeno molecular es esencial para la generación de O₂(¹ Δ_g) a través del mecanismo de fotosensibilización tipo II. Este implica una reacción de transferencia de energía desde el fotosensibilizador en su estado excitado triplete al oxígeno en su estado fundamental. Además, el oxígeno juega un papel importante en el mecanismo tipo I. En esta reacción fotoquímica, los fotosensibilizadores excitados por la luz reaccionan con un sustrato adecuado a través de una transferencia de electrones o de protones, para producir radicales libres. Estos reaccionan instantáneamente con el oxígeno dando lugar a una mezcla compleja de ROS capaces de oxidar a una gran

variedad de biomoléculas.⁴³⁵ El oxígeno también es necesario para la formación de $O_2^{\cdot-}$ que se produce a partir de la formación del radical anión del fullereno C_{60} ($C_{60}^{\cdot-}$). Por lo tanto, este experimento no es determinante para establecer el proceso de fotorreacción involucrado en la inactivación fotodinámica de *S. aureus*.

4.9.2. PDI de suspensiones celulares en D₂O

La fotoinactivación se llevó a cabo en una solución de PBS (pH=7,0) preparada con D₂O para aumentar el tiempo de vida del $O_2(^1\Delta_g)$.⁴³³ Las suspensiones tratadas con los fotosensibilizadores en D₂O y mantenidas en la oscuridad durante 30 min no vieron afectada su viabilidad (Figura N°35 y Figura N°36, columna 7). La irradiación de *S. aureus* en D₂O con TCP- C_{60}^{4+} produjo una inactivación similar a la encontrada en suspensiones celulares de PBS en agua (Figura N°36, columna 8). En cambio, la irradiación de las bacterias en D₂O con TCP- C_{60} produjo una reducción en la viabilidad celular mayor (en ~1 log) a la encontrada en suspensiones celulares de PBS en agua (Figura N°35, columna 8).

Los resultados obtenidos para TCP- C_{60}^{4+} revelan una baja contribución del mecanismo de fotosensibilización tipo II en la inactivación de *S. aureus*. Mientras que los valores encontrados para TCP- C_{60} muestran que existe una contribución del $O_2(^1\Delta_g)$ en la inactivación celular. Esta diferencia podría deberse a una localización intracelular diferente de las díadas en *S. aureus*, a efectos del D₂O en la incorporación del fotosensibilizador y a nivel de envoltura celular, y a cambios en la solubilidad de los fotosensibilizadores.

4.9.3. Efecto del ion azida en la PDI

Suspensiones celulares de *S. aureus* se trataron con TCP- C_{60} y TCP- C_{60}^{4+} (1 μ M) en presencia del ion azida (50 mM). Este ion puede desactivar tanto al $O_2(^1\Delta_g)$ como a otros compuestos en su estado excitado triplete a través de una transferencia de energía.⁴³⁵

El agregado de NaN₃ no resultó tóxico para los cultivos incubados 30 min en la oscuridad (Figura N°35 y Figura N°36, columna 9). Sin embargo, en las suspensiones irradiadas produjo una reducción casi total de los efectos fotodinámicos de ambos fotosensibilizadores (Figura N°35 y Figura N°36, columna 10). Por lo tanto, el ion azida desactiva al $O_2(^1\Delta_g)$ dando lugar a una protección casi completa de las células de *S. aureus* e impide reacciones fotoquímicas de tipo II.⁴³⁵

En un estudio previo con un derivado catiónico del fullereno C_{60} (DPC_{60}^{2+}), se observó que la PDI de *S. aureus* produce una disminución en la viabilidad celular de 4 log luego de 15 min de irradiación y, que el agregado del ion azida, da lugar a un efecto protector de 2

log en condiciones aeróbicas.²⁷⁴ Estos resultados ponen de manifiesto la generación de $O_2(^1\Delta_g)$ por parte del fotosensibilizador. Por otro lado, estudios con la porfirina TMPyP⁴⁺ y con la bacteria *Enterococcus hirae*, muestran que la azida de sodio produce un efecto protector en la PDI cuando se encuentra en concentraciones mayores a 0,01 M.⁴³⁶

4.9.4. Efecto del manitol en la PDI

Suspensiones celulares de *S. aureus* se trataron con TCP-C₆₀ y TCP-C₆₀⁴⁺ en presencia de manitol (50 mM). Este compuesto actúa como un atrapador de radicales. Por lo tanto, se empleó para verificar la presencia del mecanismo de fotorreacción tipo I.⁴⁴⁰

El manitol no resultó ser tóxico en la oscuridad luego de 30 min de incubación (Figura N°35 y Figura N°36, columna 11). Las suspensiones celulares tratadas con TCP-C₆₀ y manitol no se vieron afectadas en comparación con la PDI en ausencia de manitol al ser irradiadas con luz visible (Figura N°35, columna 12). Por otro lado, las células incubadas con TCP-C₆₀⁴⁺ y manitol mostraron un leve efecto fotoprotector con respecto a la PDI sin manitol (Figura N°36, columna 12). Esto puede deberse a una contribución de especies radicalarias en presencia de TCP-C₆₀⁴⁺.

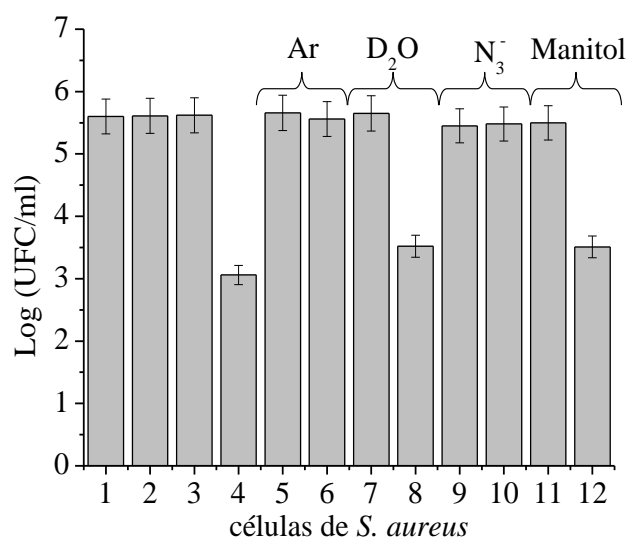


Figura N°36. Supervivencia de *S. aureus* ($\sim 10^6$ UFC/ml) incubadas con 1 μ M de TCP-C₆₀⁴⁺ en la oscuridad durante 30 min a 37°C y posterior irradiación con luz visible durante 15 min. (1) control oscuridad; (2) control irradiado; (3) control oscuridad con TCP-C₆₀⁴⁺; (4) células tratadas con TCP-C₆₀⁴⁺ e irradiadas; (5) control en atmósfera de argón; (6) células tratadas con TCP-C₆₀⁴⁺ e irradiadas en atmósfera de argón; (7) control de D₂O; (8) suspensión celular en D₂O tratada con TCP-C₆₀⁴⁺ e irradiada; (9) Control con 50 mM de NaN₃; (10) suspensión celular con NaN₃ tratada con TCP-C₆₀⁴⁺ e irradiada; (11) Control con 50 mM de manitol; (12) suspensión celular con manitol tratada con TCP-C₆₀⁴⁺ e irradiada.

Estudios previos con un derivado del fullereno C₆₀, muestran el efecto protector que produce el agregado de manitol a una suspensión celular de *C. albicans* y *E. coli*. La

disminución en la actividad fotodinámica del fotosensibilizador indica que hay un aporte significativo del mecanismo tipo I.¹⁶¹ Sin embargo, a pesar que la díada tiene en su estructura un fullereno C₆₀, presenta un comportamiento variable en función del medio en el que se encuentre.³⁰³⁻³⁰⁴ El hecho que su mecanismo de fotosensibilización sea principalmente el tipo II puede deberse a que TCP-C₆₀ se ubica en un ambiente celular menos polar que TCP-C₆₀⁴⁺ y se vea favorecida la producción de O₂(¹Δ_g).

4.10. Fotooxidación de DMA en células de *S. aureus*

Debido a que las ROS se generan en baja concentración, presentan una elevada reactividad y sus cinéticas de reacción son rápidas y muy difíciles de detectar selectivamente *in vivo*. Por lo tanto, para confirmar la producción de O₂(¹Δ_g) por parte de las díadas, dentro de células de *S. aureus*, se estudió la fotooxidación del DMA en las células bacterianas, monitoreando el decaimiento en su emisión de fluorescencia (Figura N°37). Los derivados del antraceno pueden actuar como fotosensibilizadores por ellos mismos produciendo O₂(¹Δ_g) cuando son irradiados.⁴³³ Por lo tanto, el sistema bajo estudio se iluminó en un rango de longitudes de onda en el cual el sustrato no absorbe ($\lambda_{irr} = 455-800$ nm).⁴³³ De esta manera la PDI de *S. aureus* no se vio afectada por el agregado de DMA. Además, para los estudios cinéticos se emplearon tiempos de irradiación cortos. Considerando que el DMA desactiva al O₂(¹Δ_g) por reacción química exclusivamente al formar el endoperóxido correspondiente, se empleó como un método para evaluar la capacidad de las díadas de producir O₂(¹Δ_g) en células de *S. aureus*.⁴¹⁸

A partir de los gráficos de *pseudo* primer orden característicos para la cinética de reacción del DMA (Figura N°37), se calcularon los valores de las constantes de velocidad de reacción (k_{obs}), siguiendo el cambio en el tiempo de la emisión de fluorescencia a 428 nm. Los valores de k_{obs} aumentan considerablemente en presencia de las díadas, lo que indica que se genera O₂(¹Δ_g). Se obtuvieron valores de $k_{obs} = (1,26 \pm 0,06) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ y $k_{obs} = (4,18 \pm 0,09) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ para TCP-C₆₀ y TCP-C₆₀⁴⁺, respectivamente. La eficiencia para producir O₂(¹Δ_g) en las células microbianas por parte de ambas díadas, se evaluó luego de remover el DMA que no se incorporó en las células. Bajo estas condiciones, la actividad fotodinámica se debe principalmente a los fotosensibilizadores que se encuentran unidos a las bacterias. Los resultados obtenidos en este estudio indican que la díada TCP-C₆₀ podría estar ubicada en un medio celular menos polar que TCP-C₆₀⁴⁺, por lo que la primer molécula inactiva al microorganismo principalmente mediante un mecanismo tipo II.

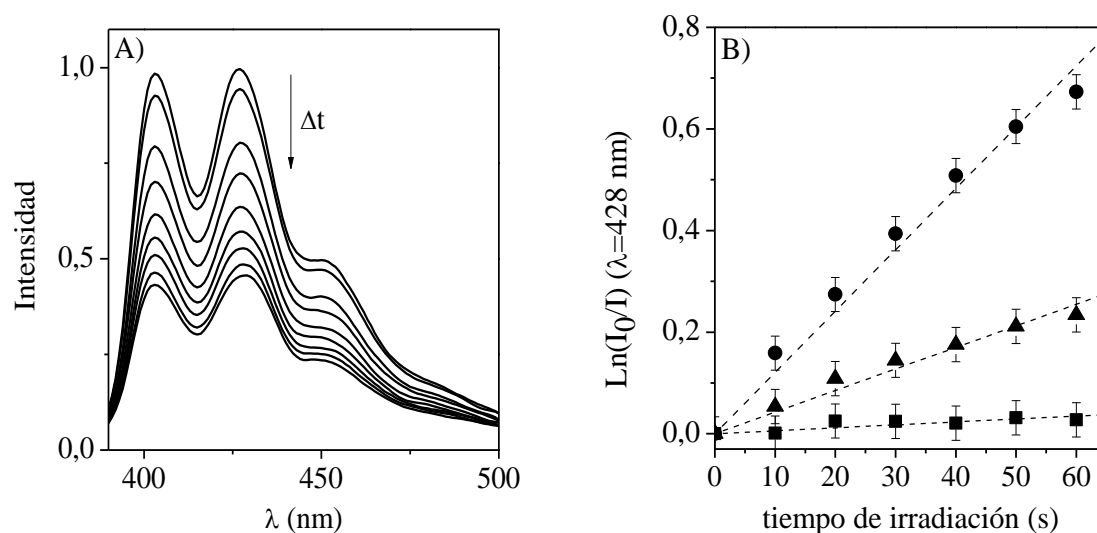


Figura N°37. (A) Espectros de emisión de fluorescencia que muestran los cambios en la fotooxidación de DMA en células de *S. aureus* mediada por TCP-C₆₀ luego de diferentes tiempos de irradiación. (B) Fotooxidación de DMA en células de *S. aureus* ($\sim 10^6$ CFU/ml) incubadas con 10 μ M de DMA durante 30 min y tratadas con los fotosensibilizadores TCP-C₆₀ (●) y TCP-C₆₀⁴⁺ (▲) en concentraciones de 1 μ M (λ_{irr} = 455-800 nm). Control: células de *S. aureus* con DMA (■). λ_{irr} = 455-800 nm.

Resultados similares se encontraron con el fotosensibilizador Zn(II)2,9,16,23-tetrakis[4-(*N*-metilpiridiloxi)]ftalocianina en células de *C. albicans*.⁴⁴⁵ A pesar que en este estudio se empleó una levadura en lugar de una bacteria Gram positiva, los resultados dejan ver que la metodología antes descrita es útil para detectar la producción de O₂(¹Δ_g) dentro de las células, independientemente del microorganismo y de la estructura del fotosensibilizador empleado.

Por otro lado, la fotooxidación del DMA producida por un derivado catiónico del fullereno C₆₀, *N,N*-dimetil-2-[4-(3-*N,N,N*-trimetilamonio)propoxi]fenil]fulleropirrolidinio (DPC₆₀²⁺), se estudió en células de *S. aureus*.²⁷⁴ Los autores observaron que este fotosensibilizador genera menos O₂(¹Δ_g) que la porfirina TMAP⁴⁺. Estos resultados pueden deberse a diferentes ubicaciones intracelulares de las moléculas en función de sus características anfifílicas, lo cual afecta directamente a la descomposición del DMA dado el corto tiempo de vida del O₂(¹Δ_g) dentro de las células.

En general, existe una competencia por el estado excitado del fotosensibilizador entre una molécula objetivo y el oxígeno en estado fundamental, y en función de quienes participen va a ser el tipo de mecanismos de acción fotodinámico que va a tener lugar. Rand y col. demostraron que el tipo de actividad fotodinámica depende del medio.⁴⁴⁶ La fotooxidación producida por el ácido urocánico y su metil éster, iniciada por radiación ultravioleta, ocurre por diferentes caminos fotoquímicos en función del microentorno. Para

la comparación, los autores emplearon tolueno, micelas y bicapas lipídicas. Así, demostraron que tanto en un medio homogéneo como en micelas, en presencia de oxígeno, se inician reacciones tipo I en donde están involucrados radicales libres.⁴⁴⁷ Por otro lado, cuando el fotosensibilizador es irradiado en la fase acuosa de bicapas lipídicas, la producción de $O_2(^1\Delta_g)$ predomina dando lugar a la reacción fotoquímica tipo II.⁴⁴⁷ Por lo tanto, los mecanismos de acción dependen de la naturaleza del medio además de la ubicación de la molécula en el mismo. No es posible realizar correlaciones directas entre los datos obtenidos en solución y en medio biológico.

4.11. Diseño de una nueva díada porfirina-fullereno C_{60}

En primera instancia se sintetizó una díada porfirina-fullereno C_{60} sustituida en posiciones *meso* por grupos carbazol llamada TCP- C_{60} . La misma se cargó mediante una metilación exhaustiva con sulfato de dimetilo obteniéndose una molécula con cuatro cargas positivas TCP- C_{60}^{4+} . Este fotosensibilizador resultó eficiente para matar la bacteria Gram positiva *S. aureus* con un 99,998% de inactivación, luego de 30 min de irradiación y con una concentración del fotosensibilizador de 1 μ M. Sin embargo, no fue eficiente para inactivar la bacteria Gram negativa *E. coli*. Este tipo de microbio son el objetivo más desafiante para cualquier tipo de tratamiento antimicrobiano. En general, los estudios *in vitro* con microorganismos, indican que las bacterias Gram positivas son susceptibles al efecto producido por una gran variedad de fotosensibilizadores inclusive por aquellos que son neutros o aniónicos, mientras que las Gram negativas son resistentes a una amplia variedad de moléculas.²⁰⁸

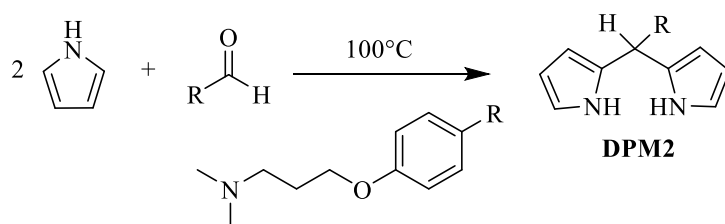
Con el objetivo de sintetizar un nuevo compuesto que fuera capaz de inactivar a *E. coli*, se diseñó una díada porfirina-fullereno C_{60} (TAP- C_{60}), la cual posee como sustituyentes en posición *meso* unidades de 4-[(3-*N,N*-dimetilamino)propoxil]fenilo. La misma se metiló exhaustivamente con sulfato de dimetilo y así se obtuvo el fotosensibilizador tetracatiónico TAP- C_{60}^{4+} .

4.12. Síntesis de díadas porfirina-fullereno C_{60} (TAP- C_{60} y TAP- C_{60}^{4+})

Las porfirinas P3 y P4 se sintetizaron a partir de la condensación de un dipirrometano apropiado y una mezcla binaria de aldehídos catalizada por ácido.^{230, 393} Para la síntesis de la porfirina P3 primero se llevó a cabo la formación del dipirrometano DPM2. Este compuesto se obtuvo a partir de la condensación de 4-[(3-*N,N*-dimetilamino)propoxil]benzaldehído con un gran exceso de pirrol (relación molar

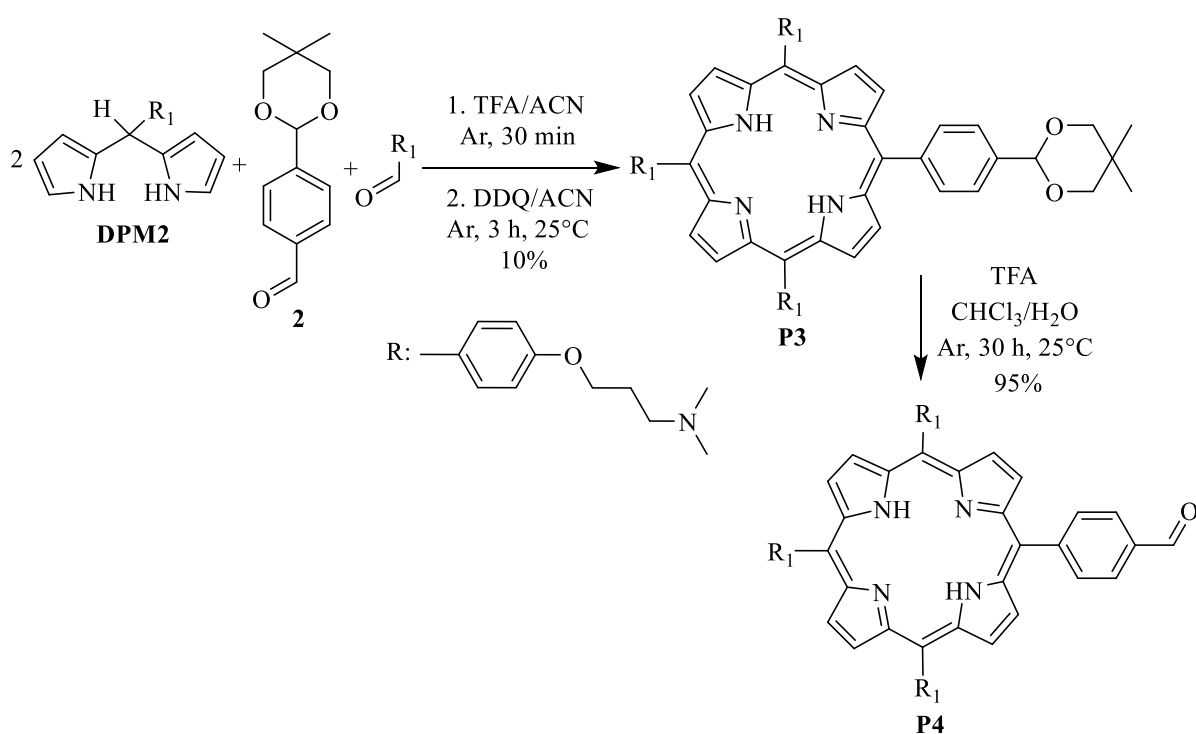
aldehído/pirrol (1:47)) el cual actúa como solvente de la reacción (Esquema N°67). La misma se llevó a cabo a 100°C y en ausencia de catalizador durante 72 h. A diferencia de la síntesis del DPM1, en este caso no se emplea el ácido TFA como catalizador dado que protona la amina terciara por lo que se reduce su concentración y no se forma el DPM2. Este mismo procedimiento se empleó para la síntesis de dipirrometanos que luego darían lugar a porfirinas y clorinas.^{199, 236} El producto de la reacción se purificó por cromatografía en columna *flash* empleando gel de sílice como fase estacionaria y la mezcla acetato de etilo/MeOH/TEA (80:20:1) como eluyente. La base se agrega a la fase móvil para prevenir la descomposición del dipirrometano en la columna, debido a que el gel de sílice es ligeramente ácido. El producto DPM2 se obtuvo con un 55% de rendimiento. Este compuesto se empleó como reactivo para la síntesis de un borodipirrometeno (BODIPY), moléculas que se conocen como “hermanas menores de las porfirinas”. La síntesis, la caracterización, los estudios fisicoquímicos y los ensayos microbiológicos, se encuentran en el Anexo de esta tesis doctoral.

Una de las funciones aldehído del tereftaldicarboxaldehído se protegió para evitar obtener múltiples productos en la condensación de MacDonald [2+2] empleada para sintetizar la porfirina deseada.²⁴² Por lo tanto, la reacción entre el tereftaldicarboxaldehído y el 2,2-dimetilpropano-1,3-diol en presencia de una cantidad catalítica del ácido *p*-toluenosulfónico calentando a reflujo en tolueno, dio el producto 4-(4,4-dimetil-2,6-dioxano-1-il)benzaldehído (Esquema N°68, compuesto 2) con un rendimiento del 45%. La condensación catalizada por ácido entre el dipirrometano DPM2 y una mezcla binaria de 4-[(3-*N,N*-dimetilamino)propoxil]benzaldehído y el benzaldehído monoprotegido 2, permitió obtener la porfirina P3 (Esquema N°68). Para alcanzar un mayor rendimiento, la reacción se realizó con la relación molar 0.8:1.0:2.0 de 4-[(3-*N,N*-dimetilamino)propoxil]benzaldehído, benzaldehído 2 y DPM2, respectivamente. Esta síntesis se lleva a cabo con una cantidad catalítica de ácido TFA a temperatura ambiente empleando cloroformo como solvente. Sin embargo, para contrarrestar la pérdida del catalizador debido a que protona los grupos amino de 4-[(3-*N,N*-dimetilamino)propoxil]benzaldehído y DPM2, el ácido se agrega en gran exceso. Pero en estudios previos, se ha demostrado que una alta concentración de ácido TFA produce la acidólisis del dipirrometano dando como resultado un mayor número de productos de reacción.²³⁵⁻²³⁶ Esto tiene como consecuencia una disminución en el rendimiento de producción del compuesto deseado. Es por ello, que para reducir este efecto y aumentar el rendimiento de la reacción, se usa un exceso de dipirrometano, en este caso DPM2, como material de partida.



Esquema N°67. Síntesis del dipirrometano DPM2.

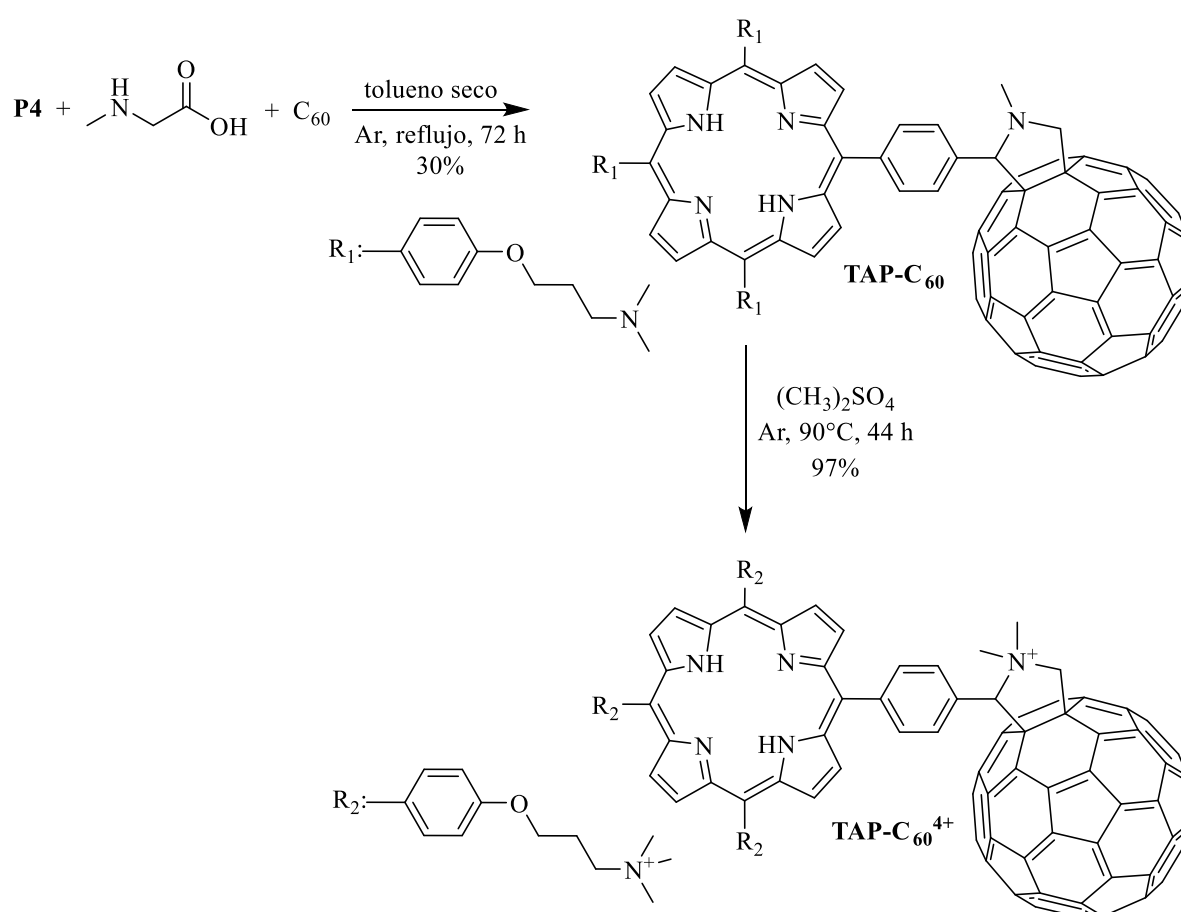
Una vez obtenido el porfirinógeno correspondiente, el posterior tratamiento oxidativo con DDQ proporcionó una mezcla de tres porfirinas con distinta simetría: A₄, A₃B y A₂B₂. Los productos se separaron por cromatografía en columna *flash* (gel de sílice) usando la siguiente mezcla de solventes: DCM/MeOH gradiente 0-20%/TEA gradiente 1-3%. En estas condiciones, la segunda banda que eluye de la columna corresponde a la porfirina deseada P3 llamada 5-(4-(5,5-dimetil-1,3-dioxan-2-il)fenil)-10,15,20-tris[4-(3-*N,N*-dimetilamino)propoxil]porfirina, obtenida con un rendimiento del 10%. En un trabajo previo, se sintetizó la porfirina simétrica TAP (A₄) con el mismo sustituyente en posiciones *meso*. Sin embargo, para crearla no fue necesario trabajar con una mezcla binaria de aldehídos por lo que se obtuvo TAP como único producto de reacción.¹⁹⁹



Esquema N°68. Síntesis de las porfirinas P3 y P4.

La hidrólisis de la porfirina P3 en una mezcla heterogénea cloroformo/agua (1:1) en presencia de un exceso de ácido TFA, produjo la porfirina P4 con un rendimiento del 95%, después de una agitación constante durante 30 h a temperatura ambiente (Esquema N°68).

La porfirina unida covalentemente al fullereno C_{60} se obtuvo mediante una cicloadición 1,3-dipolar entre la porfirina P4, *N*-metilglicina y fullereno C_{60} en relación molar 1.0:1.9:1.0, respectivamente (Esquema N°69). La mezcla se disolvió en tolueno seco y se agitó durante 18 h a reflujo en atmósfera de argón. Esta reacción produce la díada TAP- C_{60} la cual se purificó de dos maneras diferentes. Por un lado, se llevaron a cabo extracciones con tolueno y THF, obteniéndose un sólido marrón con un rendimiento del 30%. Por otro lado, el producto se purificó mediante una cromatografía en columna *flash* empleando DMF/tolueno/TEA como fase móvil. Debido a que se obtiene el mismo resultado con ambas metodologías de purificación, es recomendable realizar extracciones dado los altos costos de los solventes empleados como fase móvil en una cromatografía en columna.



Esquema N°69. Síntesis de las díadas TAP- C_{60} y TAP- C_{60}^{4+} .

Una metodología similar se utilizó previamente para sintetizar distintos derivados de porfirinas unidos covalentemente a fullereno C_{60} .²⁴² Sin embargo, no hay antecedentes de la aplicación de este procedimiento a la síntesis de díadas porfirinas-fullereno C_{60} en las que el macrociclo tetrapirrólico posea aminas terciarias alifáticas en posiciones *meso*. Esto puede deberse a que la mayoría de las díadas se sintetizan con el objetivo de crear centros de reacción fotosintéticos artificiales.⁴⁰⁴ En el proceso de fotosíntesis, la luz es absorbida

principalmente por cromóforos que actúan como antenas captadoras que transfieren la energía de excitación singlete a un centro de reacción para ser convertida en energía electroquímica. En los sistemas fotosintéticos artificiales, las antenas son muy importantes porque a través de ellas es posible captar la luz del sol y transformar esa energía en combustible o electricidad.⁴⁴⁸ Es por ello, que se busca colocar en posiciones *meso* o β , compuestos aromáticos captadores de energía.⁴⁴⁹ Como el objetivo de esta tesis es inactivar microorganismos patógenos, principalmente bacterias Gram negativas, se diseñó y sintetizó la díada TAP-C₆₀ con grupos aminos terciarios móviles.

La díada catiónica TAP-C₆₀⁴⁺ se sintetizó a partir de una metilación exhaustiva de TAP-C₆₀. Así, se trató TAP-C₆₀ con sulfato de dimetilo durante 44 h a 90 ° C (Esquema N°69).¹⁹³ El producto se purificó mediante precipitación con éter etílico y lavado del sólido con el mismo solvente, para obtener TAP-C₆₀⁴⁺ con un rendimiento del 97%. Cabe destacar, que se empleó la misma metodología de metilación que la utilizada para sintetizar TCP-C₆₀⁴⁺.

En la díada TAP-C₆₀, el macrociclo tetrapirrólico está sustituido por tres unidades de 4-[(3-*N,N*-dimetilamino)propoxil]fenilo en las posiciones *meso*. Los átomos de nitrógeno en los sustituyentes y en el anillo pirrolidinio, que unen covalentemente la porfirina con el fullereno, permitieron obtener, mediante una metilación exhaustiva, la díada TAP-C₆₀⁴⁺ que posee grupos catiónicos en la periferia del macrociclo. Así, se sintetizó un fotosensibilizador anfífilo, con cargas positivas localizadas, espaciadas del macrociclo por una cadena alifática que le confiere mayor movilidad para interactuar con la compleja membrana externa característica de bacterias Gram negativas.⁷²

4.13. Propiedades espectroscópicas de absorción y de fluorescencia

El espectro de absorción UV-visible de la díada TAP-C₆₀ se tomó en distintos solventes de diferente polaridad. La Figura N°38A muestra que el mejor solvente para solubilizar la díada es DMF. Este es un disolvente aprótico polar con elevada constante dieléctrica y por lo tanto, con mayor compatibilidad con las aminas terciarias que se encuentran como sustituyentes en posiciones *meso* del anillo tetrapirrólico.⁴⁵⁰

El espectro de absorción UV-visible para TAP-C₆₀ muestra una banda a ~330 nm debido a la presencia del fullereno C₆₀ la cual corresponde a transiciones del tipo π - π^* características de estos compuestos. Además, presenta una banda *Soret* a ~422 nm y entre 515-650 nm bandas *Q* asociadas a un macrociclo tetrapirrólico con una simetría D_{2h}.⁴⁰⁰⁻⁴⁰¹ Estas bandas en la región visible son características de porfirinas base libre.^{216, 402} El espectro

de absorción de TAP-C₆₀ muestra una banda *Soret* angosta y definida. Sin embargo, se observa un levantamiento de la línea de base a partir de los 700 nm que se acentúa más entre los 300-400 nm indicando que la díada no se encuentra en su totalidad en estado monomérico.¹⁸⁷ El espectro de absorción UV-visible para TAP-C₆₀⁴⁺ presenta las mismas bandas que la díada neutra y un levantamiento de la línea de base más marcado. Lo que indica que esta molécula está parcialmente agregada en este medio (Figura N°38B).

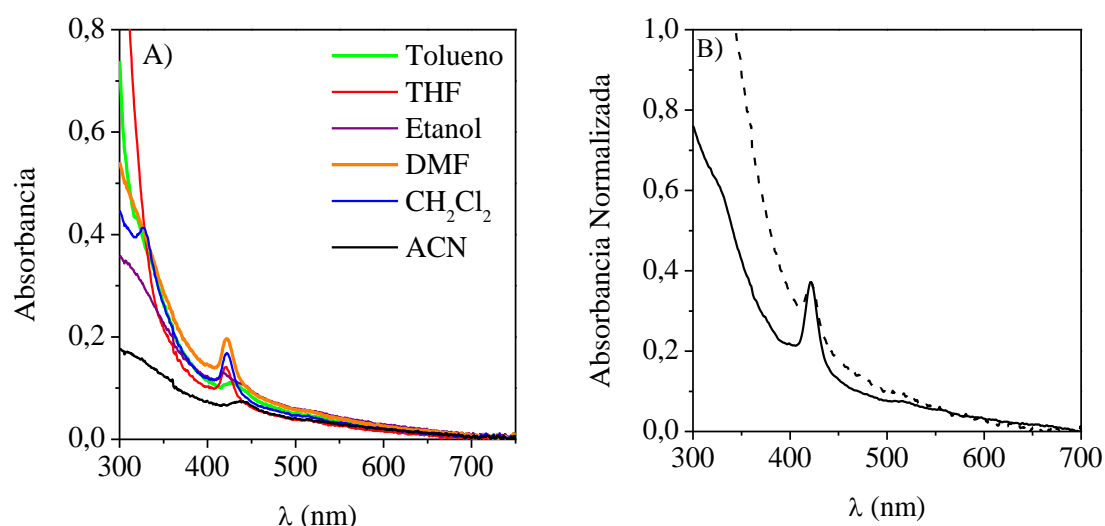


Figura N°38. (A) Espectros de absorción de la díada TAP-C₆₀ en solventes de distinta polaridad. (B) Espectro de absorción de TAP-C₆₀ (línea continua) y TAP-C₆₀⁴⁺ (línea de rayas) en DMF.

Estudios teóricos con tetrafenilporfirina (H₂TPP) y fullereno C₆₀ ponen de manifiesto que estas dos moléculas forman grandes nanoagregados por interacciones cara con cara.⁴⁵¹ Los ensayos se llevaron a cabo con hasta seis unidades de C₆₀ y H₂TPP o Zn(II)tetrafenilporfirinato (TPP-Zn). Se encontró que la contribución más importante a la energía de unión entre estas moléculas, proviene de interacciones de dispersión.⁴⁵¹ Por otro lado, Hou y Huang estudiaron las fototransformaciones de agregados de C₆₀ y C₇₀ en agua y su capacidad para producir O₂(¹Δ_g) cuando son irradiados con luz solar o con una lámpara (315 nm, 360 nm y 420 nm).²⁶⁰ Durante el desarrollo de este experimento los autores encontraron que en medios acuosos, nC₆₀ y nC₇₀ adoptan una estructura cristalina cúbica centrada en la cara (FCC). Los espectros de absorción del fullereno C₆₀ muestran que en tolueno estas moléculas se encuentran principalmente como monómeros y presentan un pico de absorción a λ=336 nm característica de estos compuestos. Mientras que, cuando el fullereno forma *clusters* en agua, la banda antes mencionada tiene un corrimiento batocrómico (λ=346 nm) y además aumenta la absorbancia entre los 400-500 nm con un pronunciado levantamiento de la línea de base.²⁶⁰ Este mismo efecto se observó con las díadas TAP-C₆₀ y TAP-C₆₀⁴⁺ en solventes de diferente polaridad (Figura N°38).

Los espectros de emisión de fluorescencia de las díadas, se compararon con la porfirina TMP en DMF, excitando las muestras a 420 nm (Figura N°39). Esta longitud de onda de excitación se eligió dado que es la única banda definida que se ve claramente en el espectro de absorción de ambas díadas. Las dos bandas alrededor de 654 y 721 nm observadas para TAP-C₆₀ y TAP-C₆₀⁴⁺ son características de porfirinas sustituidas en posición *meso*, las cuales han sido asignadas a las transiciones $Q_x(0-0)$ y $Q_x(0-1)$.⁴⁰¹

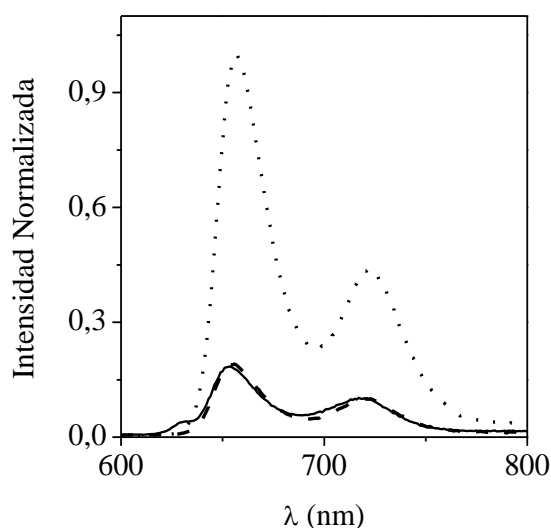


Figura N°39. Espectros de emisión de fluorescencia de TMP (línea de puntos), TAP-C₆₀ (línea continua) y TAP-C₆₀⁴⁺ (línea de rayas) en DMF. $\lambda_{exc}=420$ nm.

Debido a que la díada TAP-C₆₀ se encuentra agregada tanto en solventes polares como no polares (Esquema N°38), se dificulta visualizar en su espectro de absorción, las cuatro bandas Q características de porfirinas base libre. Es por ello, que se le tomó a TCP-C₆₀ un espectro de excitación ($\lambda_{emi}=721$ nm) en DMF el cual se muestra en la Figura N°40. En dicho espectro se observa una banda *Soret* bien definida y cuatro bandas Q (517, 552, 595 y 622 nm) que confirman la presencia de la porfirina en la díada.

Los Φ_F de estos fotosensibilizadores en DMF, se calcularon empleando como referencia la porfirina TMP. En la Figura N°39 se observa que ambas díadas muestran una emisión débil del monómero de porfirina, lo que indica una desactivación del estado excitado singlete del macrociclo por parte del fullereno C₆₀ unido covalentemente. El Φ_F para TAP-C₆₀ y TAP-C₆₀⁴⁺ es de $0,023 \pm 0,009$ y la eficiencia del *quenching* en DMF se estimó en $\eta_q > 0,75$. En estos casos, la transferencia de energía desde el estado excitado singlete de la porfirina al fullereno C₆₀ es un proceso exotérmico. El valor de η_q resultó menor a los encontrados con análogos descritos anteriormente para los derivados de porfirina unidos covalentemente a la estructura del fullereno^{242, 395, 452} incluso que los hallados para las díadas TCP-C₆₀ y TCP-C₆₀⁴⁺.

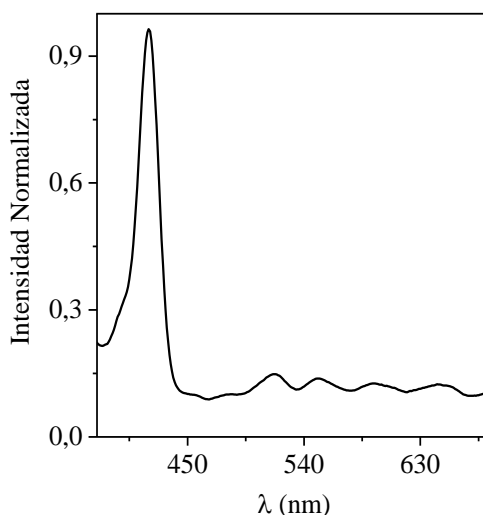


Figura N°40. Espectro de excitación de fluorescencia de TCP-C₆₀ en DMF ($\lambda_{\text{emi}} = 720$ nm).

4.14. Fotooxidación de DMA

El valor del rendimiento cuántico de producción de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ (Φ_Δ) se determinó a partir del análisis cuantitativo de la reacción que ocurre entre DMA y el $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. Se siguió espectroscópicamente la disminución de la absorbancia de DMA a $\lambda = 379$ nm.⁴¹⁸ La fotooxidación de dicho sustrato inducida por la porfirina de referencia TMP y por las díadas se estudió en DMF y en una mezcla DMF/tolueno (1:1) en condiciones aeróbicas. De esta manera los ensayos se llevaron a cabo en dos medios de diferente polaridad. No fue posible emplear una solución homogénea de tolueno dado que las díadas TAP-C₆₀ y TAP-C₆₀⁴⁺ no se solubilizan en este solvente no polar. Las muestras se irradiaron a 422 nm, longitud de onda a la cual la especie que absorbe es principalmente el macrociclo tetrapirrólico. Por lo tanto, los procesos fotofísicos en ambas díadas se iniciaron a partir de la unidad de porfirina. La fotodegradación de DMA se siguió monitoreando su descomposición a partir de los espectros de absorción. En todos los casos estudiados, la fotooxidación sigue una cinética de *pseudo* primer orden a una longitud de onda de 379 nm con respecto a la concentración de DMA. A partir de los gráficos característicos que describen el progreso de la reacción del DMA (Figura N°41), se calcularon los valores de k_{obs} para cada fotosensibilizador (Tabla N°6). Teniendo en cuenta que este sustrato es un desactivador de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ por reacción química exclusivamente, es un método utilizado para evaluar la capacidad de los fotosensibilizadores de producir $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ en solución. En DMF, TAP-C₆₀ y TAP-C₆₀⁴⁺ produjeron la descomposición de DMA, con valores de k_{obs} menores a los hallados para porfirinas. Por lo tanto, en este solvente más polar un proceso competitivo debe participar tal como un estado de separación de carga fotoinducido desde la porfirina al fullereno C₆₀.

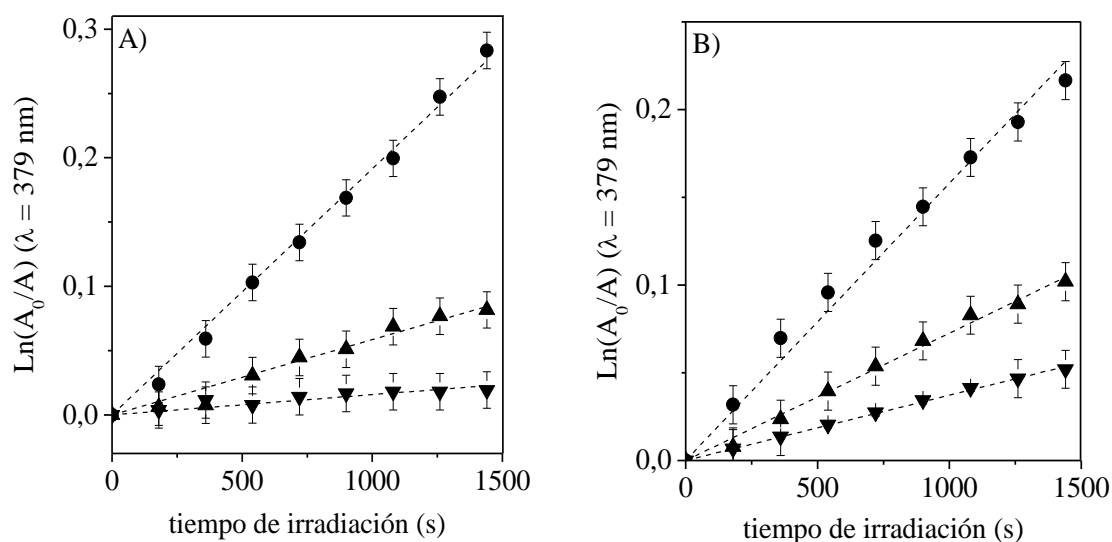


Figura N°41. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de DMA (35 μM) fotosensibilizada por la porfirina TMP (●) y, las díadas TAP- C_{60} (▲) y TAP- C_{60}^{4+} (▼) en (A) DMF y (B) DMF/tolueno (1:1) ($A^{\text{Soret}} = 0,1$; $\lambda_{\text{irr}} = 422 \pm 5$ nm).

Los datos cinéticos de descomposición de DMA se utilizaron para estimar el rendimiento cuántico de producción de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. Los valores de Φ_Δ se calcularon mediante la comparación de la pendiente obtenida para cada fotosensibilizador con el valor correspondiente a la porfirina de referencia TMP. Los valores de Φ_Δ para las díadas son menores a los obtenidos para la porfirina TMP en DMF. Esto puede ser debido a la posibilidad de estas moléculas de formar un estado de separación de carga fotoinducido en solventes polares (Tabla N°6). Sin embargo, al disminuir la polaridad del medio con el agregado de tolueno, los Φ_Δ aumentaron, lo que deja en evidencia de que en un medio menos polar las díadas tiende a producir $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ preferentemente. Resultados similares se hallaron con las díadas TCP- C_{60} y TCP- C_{60}^{4+} (sección 4.4.).

Tabla N°6. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de DMA ($k_{\text{obs}}^{\text{DMA}}$) y Trp ($k_{\text{obs}}^{\text{Trp}}$), y rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete (Φ_Δ).

Fotosensibilizador	TMP	TAP- C_{60}	TAP- C_{60}^{4+}
$k_{\text{obs}}^{\text{DMA}} (\text{s}^{-1})^{\text{a}}$	$(1,91 \pm 0,03) \times 10^{-4}$	$(5,86 \pm 0,09) \times 10^{-5}$	$(1,57 \pm 0,09) \times 10^{-5}$
$\Phi_\Delta^{\text{DMF a}}$	$0,65 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,02$	$0,05 \pm 0,03$
$k_{\text{obs}}^{\text{DMA}} (\text{s}^{-1})^{\text{b}}$	$(1,58 \pm 0,03) \times 10^{-4}$	$(7,26 \pm 0,09) \times 10^{-5}$	$(3,72 \pm 0,09) \times 10^{-5}$
$\Phi_\Delta^{\text{DMF b}}$	$0,65 \pm 0,02$	$0,30 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,03$
$k_{\text{obs}}^{\text{Trp}} (\text{s}^{-1})^{\text{a}}$	$(2,18 \pm 0,09) \times 10^{-4}$	$(5,9 \pm 0,5) \times 10^{-5}$	$(4,5 \pm 0,4) \times 10^{-5}$

^a solvente: DMF; ^b solvente: DMF/tolueno (1:1)

4.15. Fotooxidación de Trp

El efecto fotodinámico se analizó siguiendo la descomposición del aminoácido Trp a través de la disminución en su emisión de fluorescencia a 340 nm en DMF. Esta reacción sigue una cinética de *pseudo* primer orden con respecto a la concentración de Trp. A partir del ajuste lineal de gráficos de $\ln(I_0/I)$ en función del tiempo, se calcularon los valores de k_{obs}^{Trp} para la descomposición de Trp fotosensibilizada por la porfirina TMP y por las díadas TAP-C₆₀ y TAP-C₆₀⁴⁺ (Figura N°42). Comparando los valores de k_{obs}^{Trp} , se encontró que para la fotodescomposición en presencia de las díadas se obtiene un orden de magnitud menor de k_{obs}^{Trp} que para TMP (Tabla N°6). Para todos los fotosensibilizadores estudiados se observó que los valores de $k_{obs}^{Trp} > k_{obs}^{DMA}$. Estos resultados indican que la fotooxidación del sustrato está ocurriendo mediante los dos mecanismos de acción fotodinámico.

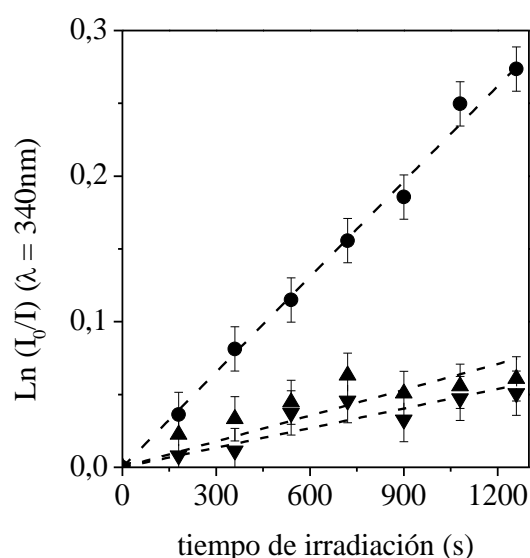


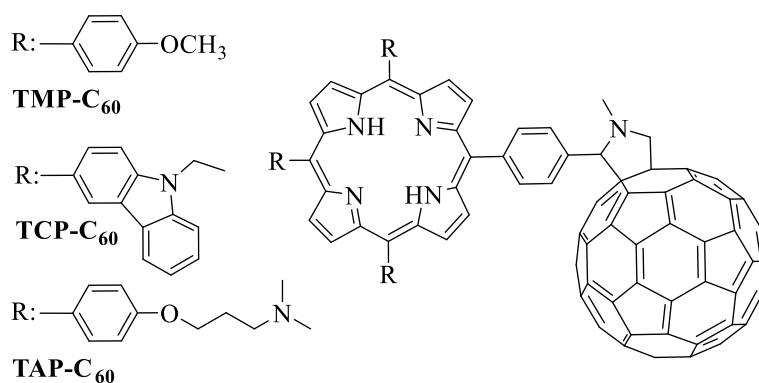
Figura N°42. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de Trp (35 μM) fotosensibilizada por la porfirina TMP (●) y las díadas TAP-C₆₀ (▲) y TAP-C₆₀⁴⁺ (▼) en DMF ($A^{Soret} = 0,1$, $\lambda_{irr} = 422 \pm 5$ nm).

4.16. Inactivación de *S. aureus* fotosensibilizada por díadas

La inactivación fotodinámica de *S. aureus* inducida por los fotosensibilizadores TMP-C₆₀, TCP-C₆₀ y TAP-C₆₀ se comparó *in vitro* (Esquema N°70). Estas moléculas tienen en común su estructura general, presentando el mismo tipo de unión covalente entre la porfirina y el fullereno C₆₀. Lo que difiere en estas tres díadas, es el sustituyente *meso* del anillo tetrapirrólico. TMP-C₆₀ posee grupos metoxi que favorecen la transferencia de carga entre la porfirina y el fullereno, TCP-C₆₀ tiene grupos carbazol rígidos que actúan como antena de captación de energía y TAP-C₆₀ tiene aminas terciarias que se protonan a pH fisiológico y una cadena alifática móvil. De esta manera, es posible determinar cuál es el sustituyente más conveniente para la PDI de *S. aureus*. Esta bacteria se seleccionó debido a que posee una

pared celular permeable y porosa que permite la difusión de los tres agentes ya sean neutros o catiónicos.¹²⁸

Suspensiones de *S. aureus* en PBS se trataron con una concentración de fotosensibilizador de 1 y 5 μM durante 30 min en la oscuridad a 37 °C. Luego, los cultivos se irradiaron con luz visible a diferentes tiempos de irradiación. La Figura N°43 muestra la supervivencia de las células bacterianas. Los experimentos control ponen de manifiesto que la viabilidad celular no se vio afectada por la iluminación de las suspensiones celulares en ausencia del fotosensibilizador ni por la incubación en la oscuridad con estos fotosensibilizadores durante 30 min. Por lo tanto, la inactivación celular observada después de la irradiación de los cultivos tratados, se debe a la PDI de los agentes fotosensibilizadores. Dada la naturaleza multicromóforo de las díadas, se puede esperar que los resultados cambien en función de cuál sea la molécula excitada. En este estudio, los cultivos se irradiaron con luz visible por lo tanto, ambos cromóforos pueden ser excitados.



Esquema N°70. Estructura química de los fotosensibilizadores TMP-C₆₀, TCP-C₆₀ y TAP-C₆₀.

La fotoinactivación de células de *S. aureus* depende de la concentración de díada empleada y de los tiempos de irradiación. Como se observa en la Figura N°43, las células de *S. aureus* mueren cuando los cultivos incubados con las díadas son expuestos a la luz visible. La suspensión bacteriana que se trató con una concentración de TCP-C₆₀ de 1 μM durante 30 min de irradiación produjo una reducción de 2,4 log en la viabilidad celular, mientras que una concentración de 5 μM dio lugar a una reducción de 5,5 unidades logarítmicas. Una menor fotoinactivación (~1 log) se encontró cuando se empleó la díada TMP-C₆₀ en una concentración de 1 μM en las mismas condiciones. Sin embargo, esta molécula a 5 μM presentó una disminución en la viabilidad celular semejante a la de TCP-C₆₀. *S. aureus* es inactivada de manera eficiente por TMP-C₆₀ y TCP-C₆₀ a altas concentraciones del fotosensibilizador. Sin embargo, los mejores resultados se obtienen con la díada TAP-C₆₀. No obstante, cuando se emplea TAP-C₆₀ en concentración de 1 μM y se irradia durante 30

min con luz visible, se logra una inactivación de ~ 5 log. Este resultado representa un valor $>99,999\%$ de inactivación celular. Por lo tanto, a bajas concentraciones, la PDI producida por TAP-C₆₀ es significativamente más eficaz que por TCP-C₆₀ y TMP-C₆₀ (Figura N°43A). Estos resultados están de acuerdo con una de las características que debe reunir un fotosensibilizador para ser empleado en PDI. Esto es, una baja concentración del fotosensibilizador que produzca una disminución significativa de la viabilidad celular, lo que permite una mayor selectividad por las células bacterianas.⁷⁰

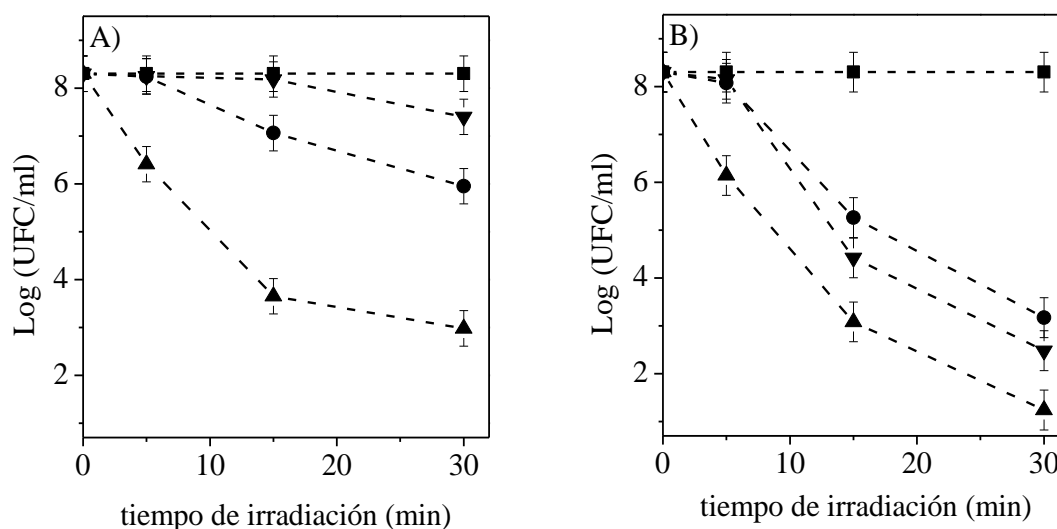


Figura N°43. Supervivencia de *S. aureus* ($\sim 10^8$ UFC/ml) incubadas con (A) 1 μ M y (B) 5 μ M de: TCP-C₆₀ (●), TMP-C₆₀ (▼) y TAP-C₆₀ (▲) durante 30 min a 37 °C en la oscuridad y expuestas a la luz visible durante diferentes tiempos de irradiación. Control (■).

Las bacterias Gram positivas tienen una pared celular de peptidoglicano que es atravesada por ácidos teitoicos y lipoteitocos. Esta envoltura posee un alto grado de porosidad, que le permite a los fotosensibilizadores difundir fácilmente hacia la membrana plasmática interna.¹¹¹⁻¹¹² Así, se estudió la PDI de *S. aureus* con los compuestos TCP-C₆₀⁴⁺, TAP-C₆₀ y TAP-C₆₀⁴⁺. La díada sustituida en posiciones *meso* por grupos carbazol (TCP-C₆₀⁴⁺) dio muy buenos resultados de PDI para *S. aureus* (sección 4.8.), es por ello que se empleó para comparar su eficiencia con la nueva díada sintetizada TAP-C₆₀⁴⁺. En estudios previos se ha demostrado que las aminas terciarias, pueden adquirir carga positiva a pH fisiológico dada su basicidad.¹⁹³ Las moléculas 3-*N,N*-dimetilamino-1-propanol y *N*-metilpirrolidina poseen una pKa (logaritmo negativo de la constante de disociación ácida de un ácido débil) de 9,27 y 10,46, respectivamente.⁴⁵³ Así, el fotosensibilizador TAP-C₆₀ puede adquirir hasta cuatro cargas positivas en PBS. Es por ello, que su eficiencia para la PDI de bacterias se comparó con las díadas TCP-C₆₀⁴⁺ y TAP-C₆₀⁴⁺.

Suspensiones de *S. aureus* en PBS se trataron con una concentración de fotosensibilizador de 1 μM durante 30 min en la oscuridad a 37 °C. La Figura N°44 muestra la supervivencia de las células bacterianas las cuales mueren cuando las díadas son expuestas a la luz visible. La suspensión de *S. aureus* que se trató con TCP- C_{60}^{4+} en concentración 1 μM durante 30 min de irradiación, produjo una reducción de $\sim 2,7$ log en la viabilidad celular, mientras que con TAP- C_{60} se logró una disminución en la viabilidad celular de 5,5 unidades logarítmicas. Este resultado se debe a que la segunda díada, posee tres cadenas carbonadas móviles que están cargada a pH fisiológico, lo cual le permite interaccionar mejor con la pared celular bacteriana. Además, los sustituyentes en posición *meso* de TAP- C_{60} y el anillo pirrolidinio, poseen una carga positiva puntual a diferencia de los grupos carbazol en TCP- C_{60}^{4+} cuya carga está deslocalizada. Sin embargo, la mayor inactivación fotodinámica se logró con la díada TAP- C_{60}^{4+} . Luego de 5 min de irradiación se produjo una erradicación completa de *S. aureus*. En este caso se dice que la inactivación fue del 100% dado que no se contaron colonias al sembrar la totalidad del PBS con los microbios. Por lo tanto, este fotosensibilizador es muy prometedor para poder ser empleado en la PDI de infecciones producida por este microorganismo.

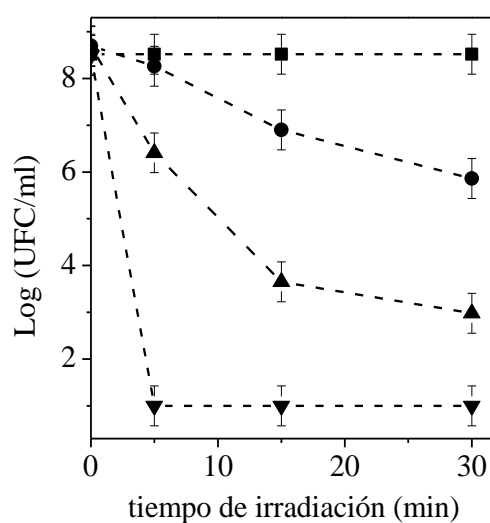


Figura N°44. Supervivencia de *S. aureus* ($\sim 10^8$ UFC/ml) incubadas con 1 μM de: TCP- C_{60}^{4+} (●) TAP- C_{60} (▲) y TAP- C_{60}^{4+} (▼) durante 30 min a 37 °C en la oscuridad y expuestas a la luz visible durante diferentes tiempos de irradiación. Control (■).

En un trabajo previo, se llevaron a cabo estudios con un fullereno C_{60} sustituido por el grupo funcional 4-[(3-*N,N*-dimetilamino)propoxi]fenilo, que permitió obtener el compuesto *N*-metil-2-[4-(3-*N,N*-dimetilaminopropoxi)fenil]fulleropirrolidina (MPC $_{60}$).¹⁹⁷ El mismo se metiló exhaustivamente y se obtuvo un fullereno dicatiónico llamado DPC $_{60}^{2+}$. Este compuesto se empleó para inactivar células de *S. aureus*. Lo que los autores encontraron, es

que luego de 30 min de irradiación se observa una disminución en la supervivencia celular de 4,8 log.¹⁹⁷ Este resultado representa un valor mayor al 99,998% de inactivación celular. Por otro lado, suspensiones bacterianas de *S. aureus* se trataron con 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N*-dimetilaminopropoxil)fenil]porfirina (TAPP) con una concentración de 5 μ M. Después de 2 min de irradiación se produjo un descenso en la viabilidad celular en más de 7 log.¹⁹⁹ Estos resultados representan un valor mayor al 99,9999% de inactivación celular. Por otra parte, cuando el mismo estudio se llevó a cabo con una concentración 1 μ M de se logró una inactivación de 5 log (99,999%). En estas condiciones, se produce una erradicación completa de *S. aureus* después de 30 min de irradiación.¹⁹⁹

De los resultados observados en trabajos previos y en esta tesis doctoral, se pone en evidencia que el sustituyente 4-[(3-*N,N*-dimetilamino)propoxi]fenilo es eficiente para inactivar *S. aureus*, posiblemente dada su capacidad de interactuar con la pared celular de esta bacteria. Además, tanto las porfirinas como el fullereno C₆₀ son fotosensibilizadores eficaces para producir la muerte de microorganismos.^{85, 197, 201}

4.17. Inactivación de *E. coli* fotosensibilizada por díadas

La inactivación fotodinámica de *E. coli* inducida por los fotosensibilizadores TCP-C₆₀⁴⁺, TAP-C₆₀ y TAP-C₆₀⁴⁺ se comparó *in vitro*. Esta bacteria se seleccionó debido a que posee una membrana externa compleja cargada negativamente que vuelve al microbio difícil de erradicar. Así, para la PDI de estas bacterias se emplean moléculas cargadas positivamente dado que favorece la atracción electrostática entre la molécula y el microbio mejorando su inactivación. Además, los fotosensibilizadores no solamente generan ROS sino que también desestabilizan la envoltura celular produciendo la muerte del microorganismo.^{75, 454}

Luego del tratamiento de *E. coli* con una concentración 1 μ M de cada fotosensibilizador durante 30 min a 37°C en la oscuridad, los cultivos se irradiaron con luz visible. Experimentos control mostraron que la viabilidad de *E. coli* no se vio afectada por la iluminación, o por la incubación con 1 μ M de las díadas en la oscuridad, indicando que la mortalidad celular obtenida posterior a la irradiación de los cultivos es debida al efecto del agente fotosensibilizador activado por la luz visible.

Como se observa en la Figura N°45, la inactivación celular fotosensibilizada por la díada TAP-C₆₀ a una concentración de 1 μ M y después de 30 min de irradiación, produce un decaimiento de ~5,8 log en la viabilidad celular. Esto representa más del 99,999% de inactivación de células de *E. coli*. Sin embargo, a pesar que TCP-C₆₀⁴⁺ posee cuatro cargas

positivas no inactiva este microorganismo Gram negativo. Posiblemente por la estructura rígida y la carga deslocalizada de los grupos carbazol en las posiciones *meso* del macrociclo tetrapirrólico, que no le permiten interaccionar con la membrana externa compleja de *E. coli*. Por otra parte, con la díada TAP-C₆₀⁴⁺, se logra una inactivación total de este microbio a todos los tiempos de irradiación. Este mismo resultado se observó con la bacteria Gram positiva *S. aureus* (sección 4.16).

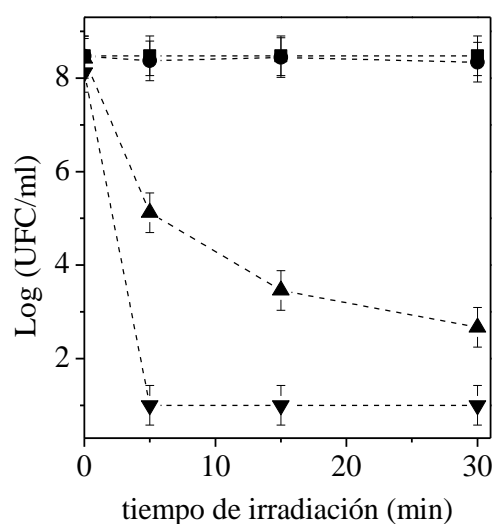


Figura N°45. Supervivencia de *E. coli* (~10⁸ UFC/ml) incubadas con 1 μ M de: TCP-C₆₀⁴⁺ (●) TAP-C₆₀ (▲) y TAP-C₆₀⁴⁺ (▼) durante 30 min a 37 °C en la oscuridad y expuestas a la luz visible durante diferentes tiempos de irradiación. Control (■).

En un trabajo previo, se empleó como fotosensibilizador 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N*-dimetilaminopropoxil)fenil]porfirina (TAPP), que en posiciones *meso* posee el mismo sustituyente y número de cargas que la díada TAP-C₆₀⁴⁺. Cuando las células de *E. coli* se incubaron con 1 μ M de TAPP, se logró una disminución en la supervivencia celular de 5 log después de 30 min de irradiación. La fotoinactivación de esta bacteria también se llevó a cabo con TAPP pero a una concentración de 5 μ M y se logró una inactivación de 7 log después de 30 min de irradiación, resultados que representan un valor mayor al 99,9999% de inactivación celular.¹⁹⁹ Estos autores, sintetizaron macrociclos tetrapirrólicos con los mismos sustituyentes en posiciones *meso* que los presentes en la molécula TAP-C₆₀ de esta tesis doctoral y sus resultados ponen de manifiesto, que el sustituyente [4-(3-*N,N*-dimetilamino)propoxil]fenilo interacciona fuertemente con la membrana de bacterias Gram negativas produciendo su muerte de manera eficiente.

Camino y col. estudiaron la inactivación fotodinámica de *E. coli* producida por una porfirina tricatiónica A₃B³⁺ la cual posee tres sustituyentes 4-[(3-*N,N*-dimetilamino)propoxil]fenilo en posiciones *meso*.¹⁹⁸ Los estudios de inactivación se llevaron

a cabo con un número de células de $\sim 10^6$ UFC/ml y en tubos de ensayo. A pesar que las condiciones experimentales son diferentes a las presentadas en esta sección, se obtuvieron muy buenos resultados que dejan en evidencia la eficiencia de este sustituyente. Empleando A_3B^{3+} en concentración 1 μM y luego de 20 min de irradiación se logró una disminución en la supervivencia celular de $\sim 4,5$ log. Este resultado representa un valor mayor al 99,997% de inactivación celular. Además, encontraron que la actividad fotodinámica de A_3B^{3+} es más alta que la de la porfirina tetracatiónica A_4^{4+} en las mismas condiciones experimentales.¹⁹⁸

La díada TAP- C_{60} tiene la particularidad de estar cargada a pH fisiológico, por lo que posee cuatro cargas positivas intrínsecas en PBS.¹⁹³ Algunos estudios han demostrado que un alto número de cargas positivas hacen que el fotosensibilizador sea muy eficiente contra bacterias Gram negativas, pero que un menor número de estas son mejores para matar bacterias Gram positivas y hongos.^{169, 207} Así, se procedió a una metilación exhaustiva con sulfato de dimetilo de TAP- C_{60} , lo que permitió obtener TAP- C_{60}^{4+} . Los resultados de inactivación fotodinámica empleando TAP- C_{60}^{4+} como fotosensibilizador ponen de manifiesto que se logran erradicar las bacterias *S. aureus* y *E. coli* a una concentración de 1 μM y luego de 15 min de irradiación. Estas son condiciones óptimas para producir una inactivación fotodinámica efectiva ocasionando un daño mínimo en las células del huésped.⁷⁰ De esta manera, se diseñó una nueva díada TAP- C_{60}^{4+} más efectiva que TCP- C_{60}^{4+} para inactivar *S. aureus* y capaz de matar *E. coli*. Posiblemente, esta diferencia tan marcada se deba a la creación de un nuevo fotosensibilizador con significativo carácter anfifílico, con cargas positivas puntuales, libres y espaciadas que le permite interaccionar mejor con la compleja membrana externa característica de bacterias Gram negativas produciendo su muerte posterior a su iluminación.

Recientemente, Simões y col. han demostrado una vez más que derivados de porfirinas con cargas positivas, son excelentes fotosensibilizadores para la PDI de bacterias.²⁰⁸ En este estudio se evaluó cómo la carga del fotosensibilizador por sí misma, influye en la inactivación de la bacteria Gram negativa *E. coli*. Para ello, se utilizaron cinco porfirinas catiónicas con los mismos sustituyentes en posiciones *meso* pero en diferente número. Los resultados muestran que el rendimiento de producción de $O_2(^1\Delta_g)$, el número de cargas, la distribución de las mismas, la formación de agregados y la anfifilicidad molecular, son características importantes que contribuyen a la eficiencia de un fotosensibilizador para la PDI. De los ensayos llevados a cabo se observó que la porfirina con una carga positiva y el macrociclo tetrapirrólico con dos cargas positivas en posiciones *trans*, son poco efectivas para inactivar *E. coli*. Sin embargo, las porfirinas tri y tetra catiónicas y el macrociclo *cis*

con dos sustituyentes cargados en posiciones *meso*, resultaron ser los fotosensibilizadores más eficientes para erradicar este microorganismo Gram negativo.²⁰⁸ En consecuencia, es importante considerar el número y la distribución de carga como así también las características de los sustituyentes en posiciones *meso* a la hora de diseñar un nuevo fotosensibilizador, en particular para la inactivación fotodinámica de bacterias Gram negativas.

4.18. Mecanismo de acción fotodinámica *in vitro*

Con el fin de obtener información acerca del principal mecanismo de fotorreacción involucrado en la inactivación de *S. aureus*, se realizaron una serie de experimentos en diferentes condiciones, tales como una atmósfera de argón, suspensiones celulares en D₂O y la adición del ion de azida o de manitol. En los ensayos se empleó una concentración de TAP-C₆₀ de 1 μ M y de TAP-C₆₀⁴⁺ de 0,5 μ M y el tiempo de irradiación de los cultivos fue de 15 min y 5 min, respectivamente. Estos tiempos de iluminación se seleccionaron debido a que producen una reducción en la viabilidad celular de ~2 log para ambas díadas, lo que permite ver una disminución o un aumento en la PDI al cambiar las condiciones del experimento.

4.18.1. PDI en una atmósfera anóxica

Suspensiones celulares de *S. aureus* tratadas con TAP-C₆₀ y TAP-C₆₀⁴⁺ se irradiaron en una atmósfera de argón. Este experimento se utilizó para evaluar la importancia del oxígeno en la inactivación fotodinámica y para determinar la capacidad que posee la díada de actuar en condiciones anóxicas. Las suspensiones tratadas con los dos fotosensibilizadores bajo estas circunstancias y mantenidas en la oscuridad por 30 min, no se vieron afectadas (Figura N°46 y Figura N°47, columna 5). Por otro lado, se observó que la pérdida de viabilidad es altamente dependiente del oxígeno atmosférico dado que no hubo inactivación en ausencia del mismo (Figura N°46 y Figura N°47, columna 6).

Los resultados muestran que el efecto fotocitotóxico inducido por TAP-C₆₀ y TAP-C₆₀⁴⁺ es insignificante en condiciones anóxicas. Los mismos resultados se hallaron previamente con las díadas TCP-C₆₀ y TCP-C₆₀⁴⁺. Por lo tanto, la presencia del oxígeno molecular es esencial para que los fotosensibilizadores sean capaces de generar ROS a través de los mecanismo de acción tipo I y tipo II.⁴³⁵ Por lo tanto, este experimento no es determinante para establecer el proceso de fotorreacción involucrado en la inactivación fotodinámica de *S. aureus*.

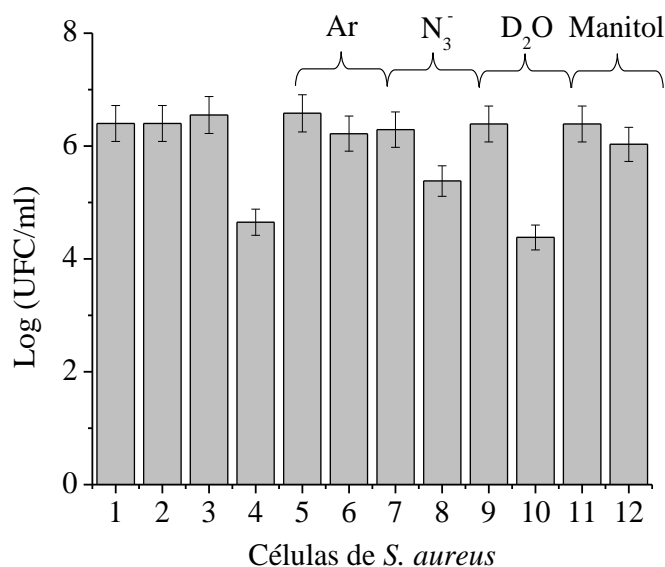


Figura N°46. Supervivencia de *S. aureus* ($\sim 10^6$ UFC/ml) incubadas con $1 \mu\text{M}$ de TAP- C_{60} en la oscuridad durante 30 min a 37°C y posterior irradiación con luz visible durante 15 min. (1) control oscuridad; (2) control irradiado; (3) control oscuridad con TCP- C_{60} ; (4) células tratadas con TCP- C_{60} e irradiadas; (5) control en atmósfera de argón; (6) células tratadas con TCP- C_{60} e irradiadas en atmósfera de argón; (7) Control con 50 mM de NaN_3 ; (8) suspensión celular con NaN_3 tratada con TCP- C_{60} e irradiada; (9) control de D_2O ; (10) suspensión celular en D_2O tratada con TCP- C_{60} e irradiada; (11) Control con 50 mM de manitol; (12) suspensión celular con manitol tratada con TCP- C_{60} e irradiada.

4.18.2. PDI de suspensiones celulares en D_2O

La fotoinactivación se llevó a cabo en una solución de PBS ($\text{pH}=7,0$) preparada con D_2O .⁴³³ Las suspensiones tratadas con los fotosensibilizadores en D_2O y mantenidas en la oscuridad durante 30 min no vieron afectada su viabilidad (Figura N°46 y Figura N°47, columna 9). La irradiación de *S. aureus* en D_2O con TAP- C_{60} produjo una inactivación similar a la encontrada en las suspensiones celulares de PBS en agua (Figura N°46, columna 10). En cambio, la irradiación de las bacterias en D_2O con TAP- C_{60}^{4+} produjo una reducción en la viabilidad celular mayor (en ~ 1 log) a la encontrada en suspensiones celulares de PBS en agua (Figura N°47, columna 10).

Los resultados obtenidos para TAP- C_{60} revelan una baja contribución del mecanismo de fotosensibilización tipo II en la inactivación de *S. aureus*. Mientras que los valores encontrados para TAP- C_{60}^{4+} muestran que existe una contribución del $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ en la inactivación celular. Esta diferencia podría deberse a una localización intracelular diferente de las díadas en *S. aureus*, a efectos del D_2O en la incorporación del fotosensibilizador y a nivel de envoltura celular y a cambios en la solubilidad de los fotosensibilizadores.

4.18.3. Efecto del ion azida en la PDI

Suspensiones celulares de *S. aureus* se trataron con TAP-C₆₀ y TAP-C₆₀⁴⁺ en presencia del ion azida (50 mM). Este ion puede desactivar tanto al O₂(¹Δ_g) como a otros compuestos en su estado excitado triplete a través de una transferencia de energía.⁴³⁵ El agregado de NaN₃ no resultó tóxico para los cultivos incubados 30 min en la oscuridad (Figura N°46 y Figura N°47, columna 7). Sin embargo, en las suspensiones irradiadas produjo una reducción de los efectos fotodinámicos de ambos fotosensibilizadores (Figura N°46 y Figura N°47, columna 8). Por lo tanto, el ion azida desactiva al O₂(¹Δ_g) dando lugar a una protección de las células de *S. aureus* pero no de modo completo lo cual puede deberse a diversos factores. Por un lado, a la existencia de una contribución del mecanismo de acción fotodinámico tipo I. Por el otro, debido a que la concentración de la azida de sodio en el microentorno celular, no es suficiente para desactivar todo el O₂(¹Δ_g) generado debido a la pérdida del mismo por atracción electrostática con la díada. La última causa se atribuye a que el ion azida se localiza en un sitio diferente al lugar en el que está el fotosensibilizador, no pudiendo sensar la generación de ROS producidas.

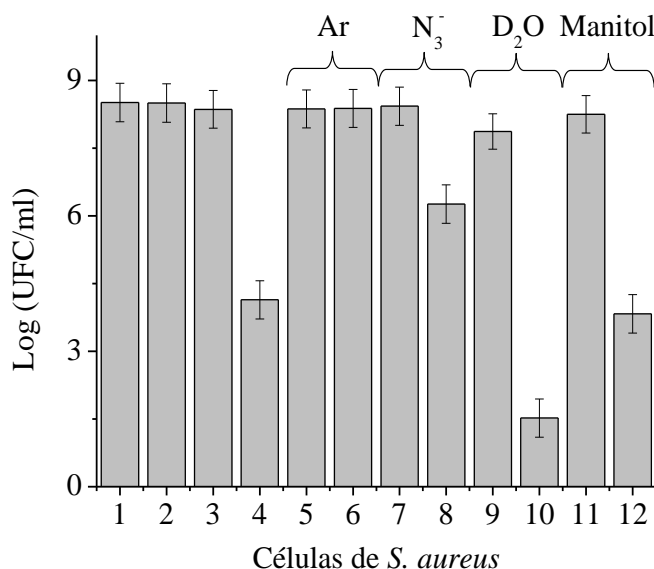


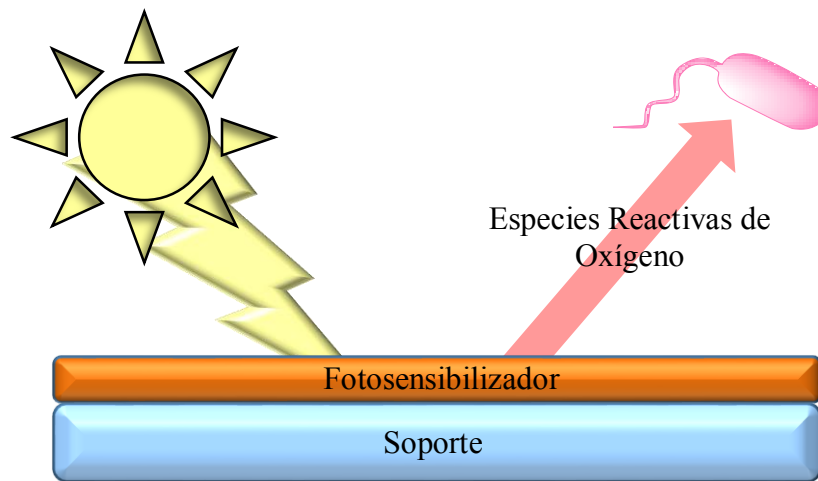
Figura N°47. Supervivencia de *S. aureus* (~10⁶ UFC/ml) incubadas con 0,5 μM de TAP-C₆₀⁴⁺ en la oscuridad durante 30 min a 37°C y posterior irradiación con luz visible durante 5 min. (1) control oscuridad; (2) control irradiado; (3) control oscuridad con TCP-C₆₀; (4) células tratadas con TCP-C₆₀ e irradiadas; (5) control en atmósfera de argón; (6) células tratadas con TCP-C₆₀ e irradiadas en atmósfera de argón; (7) Control con 50 mM de NaN₃; (8) suspensión celular con NaN₃ tratada con TCP-C₆₀ e irradiada; (9) control de D₂O; (10) suspensión celular en D₂O tratada con TCP-C₆₀ e irradiada; (11) Control con 50 mM de manitol; (12) suspensión celular con manitol tratada con TCP-C₆₀ e irradiada.

4.18.4. Efecto del manitol en la PDI

Suspensiones celulares de *S. aureus* se trataron con TAP-C₆₀ y TAP-C₆₀⁴⁺ en presencia de manitol (50 mM). Este compuesto actúa como un atrapador de radicales. Por lo tanto, este sustrato se empleó para verificar la presencia del mecanismo de fotorreacción tipo I.⁴⁴⁰ El manitol no resultó ser tóxico en la oscuridad luego de 30 min de incubación (Figura N°46 y Figura N°47, columna 11). Las suspensiones celulares tratadas con TAP-C₆₀ y manitol, mostraron una reducción casi total de los efectos fotodinámicos (Figura N°46, columna 12). Este efecto fotoprotector puede deberse a una contribución de especies radicalarias en presencia de TAP-C₆₀. Es decir que existe un aporte importante del mecanismo de acción tipo I. Por otro lado, las células incubadas con TAP-C₆₀⁴⁺ y manitol mostraron un leve efecto fotoprotector con respecto a la PDI sin manitol (Figura N°47, columna 12). Este resultado indica que el mecanismo de acción fotodinámica que prima es el tipo II.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Superficies Antimicrobianas



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.19. Obtención de polímeros antibacterianos

4.19.1. Experimentos electroquímicos

Para la construcción de superficies antibacterianas se emplearon los fotosensibilizadores TCP, ZnTCP y TCP-C₆₀. Todas estas moléculas poseen grupos carbazol en posiciones *meso* capaces de electropolimerizar. Es por ello, que se empleó la voltametría cíclica para la generación de diferentes superficies fotoinactivantes. La Figura N°48 muestra los voltamogramas cíclicos de TCP-C₆₀ en solución de *o*-DCB utilizando un electrodo de trabajo de Pt y con TBAP como electrolito soporte.

Como puede verse en la Figura N°48, los dos primeros procesos de oxidación son reversibles y no se observan cambios en las corrientes de Faraday durante el ciclo continuo, sólo han sido afectadas por la difusión. Cuando se produce una reacción electroquímica sobre un electrodo, se consume la sustancia electro-activa que está en sus proximidades, de forma que la reacción se detendría si no interviniesen fenómenos de transporte encargados de reponer la materia consumida. La transferencia de materia desde el seno de la solución al electrodo está dominada por tres tipos de procesos: migración, convección y difusión.⁴⁵⁵ El transporte de materia por migración se produce por el movimiento de una especie cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. Por otro lado, la convección consiste en el desplazamiento de sustancias bajo la influencia de agitación o cualquier otra forma de transporte hidrodinámico. Finalmente la difusión, es el movimiento de una especie bajo la influencia de un gradiente de potencial químico.⁴⁵⁵ Las medidas de voltametría cíclica que aquí se presentan, se llevaron a cabo con un exceso de electrolito soporte (0,1 M de TBAP) con el fin de minimizar los procesos de migración de las especies cargadas en estudio, y en ausencia de agitación o calentamiento (estado estacionario) para minimizar los procesos convectivos en tiempos menores que el minuto, de manera tal que la convección natural no interfiera. Así, las reacciones electroquímicas sólo estuvieron afectadas por la difusión de las especies electroactivas. Esto se corroboró mediante un estudio de la respuesta de las películas electrodepositadas en función de la velocidad de barrido, en donde se observa que las corrientes de pico son proporcionales a la velocidad de barrido de potencial, lo que da indicios de la formación de una película adsorbida sobre el electrodo a través de reacciones gobernadas por procesos de difusión (resultados no mostrados).⁴⁵⁶

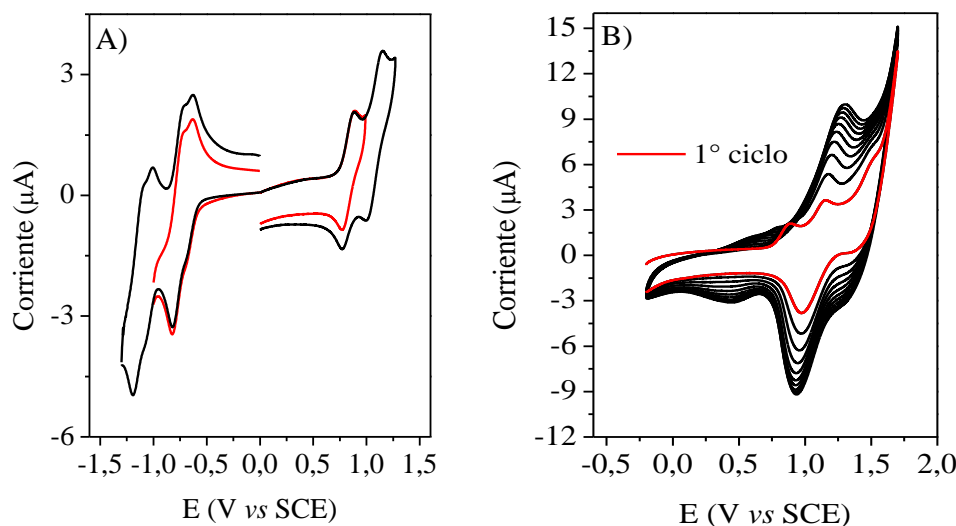


Figura N°48. (A) Primer barrido anódico y catódico de TCP-C₆₀ a diferentes potenciales de inversión y (B) diez ciclos de VC tomados en *o*-DCB con TBAP como electrolito soporte utilizando Pt como electrodo de trabajo. La línea roja muestra la primera capa luego de la deposición con Pt como electrodo de trabajo. Todas las VC se obtuvieron con una velocidad de barrido de 100 mV/s.

Los dos primeros procesos de oxidación reversibles que se observan en la Figura N°48, se pueden atribuir a la generación del catión radical en el macrociclo tetrapirrólico, que es lo que se observa comúnmente en este tipo de centros conjugados.⁴⁵⁷ Sin embargo, el proceso de reducción es más complejo, dado que se generan una serie de ondas superpuestas durante el barrido del potencial. En la díada tanto la porfirina como el fullereno, se pueden reducir de forma reversible dando lugar a la respuesta voltamétrica observada (Figura N°48A). Este comportamiento es típico de estas estructuras y ha sido bien documentado.³⁰² Por otro lado, cuando el potencial aplicado en el escaneo anódico se extiende hasta 1,7 V se produce el tercer proceso oxidativo y se observa un incremento continuo en las corrientes de Faraday lo que se pone de manifiesto en cada uno de los ciclos voltamétricos aplicados de manera sucesiva (Figura N°48B). Estos incrementos, se deben a la formación de una película polimérica en la superficie del electrodo, generado por el acoplamiento de cationes radicales del carbazol. Estos resultados se observaron en estudios previos de porfirinas con sustituyentes carbazol en posiciones *meso*.^{381, 399} Además, para confirmar que el producto electroactivo se adsorbió sobre la superficie del electrodo de Pt, éste se retiró de la solución que contiene la díada, y se colocó en una celda electroquímica que sólo poseía el electrolito soporte en DCE. Luego, se sometió a procesos de oxidación-reducción de superficie y los resultados obtenidos confirmaron la existencia del polímero en la superficie del electrodo (los resultados de este ensayo no se muestran). También, las superficies poliméricas generadas se caracterizaron electroquímicamente. Una electropolimerización similar se

realizó sobre electrodos semitransparentes de ITO obteniéndose películas del fotosensibilizador de gran área como lo muestra la Figura N°49B. Con estas superficies se llevaron a cabo los estudios espectroscópicos, de fotooxidación de sustratos y de inactivación fotodinámica.

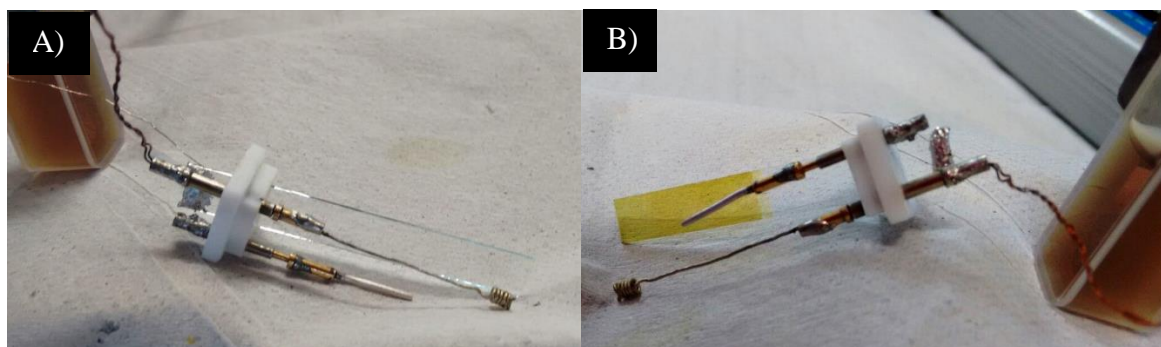
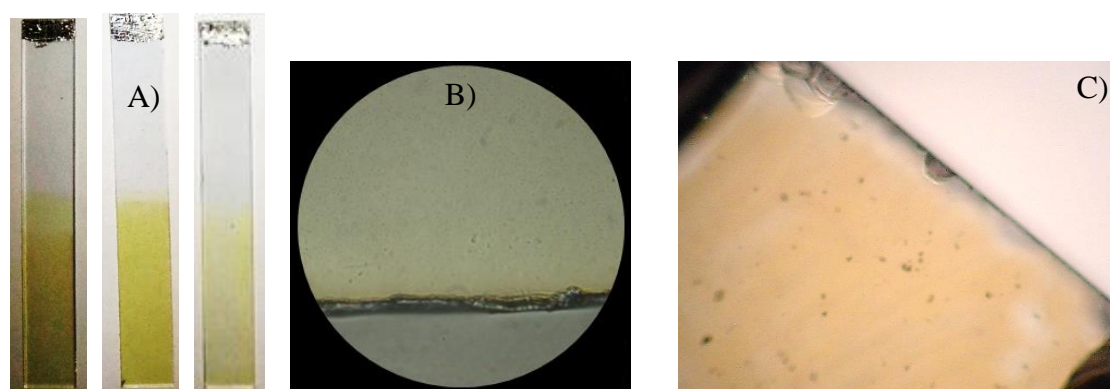


Figura N°49. (A) ITO antes de la electropolimerización. (B) ITO con la bicapa ZnTCP/TCP electrodepositada.

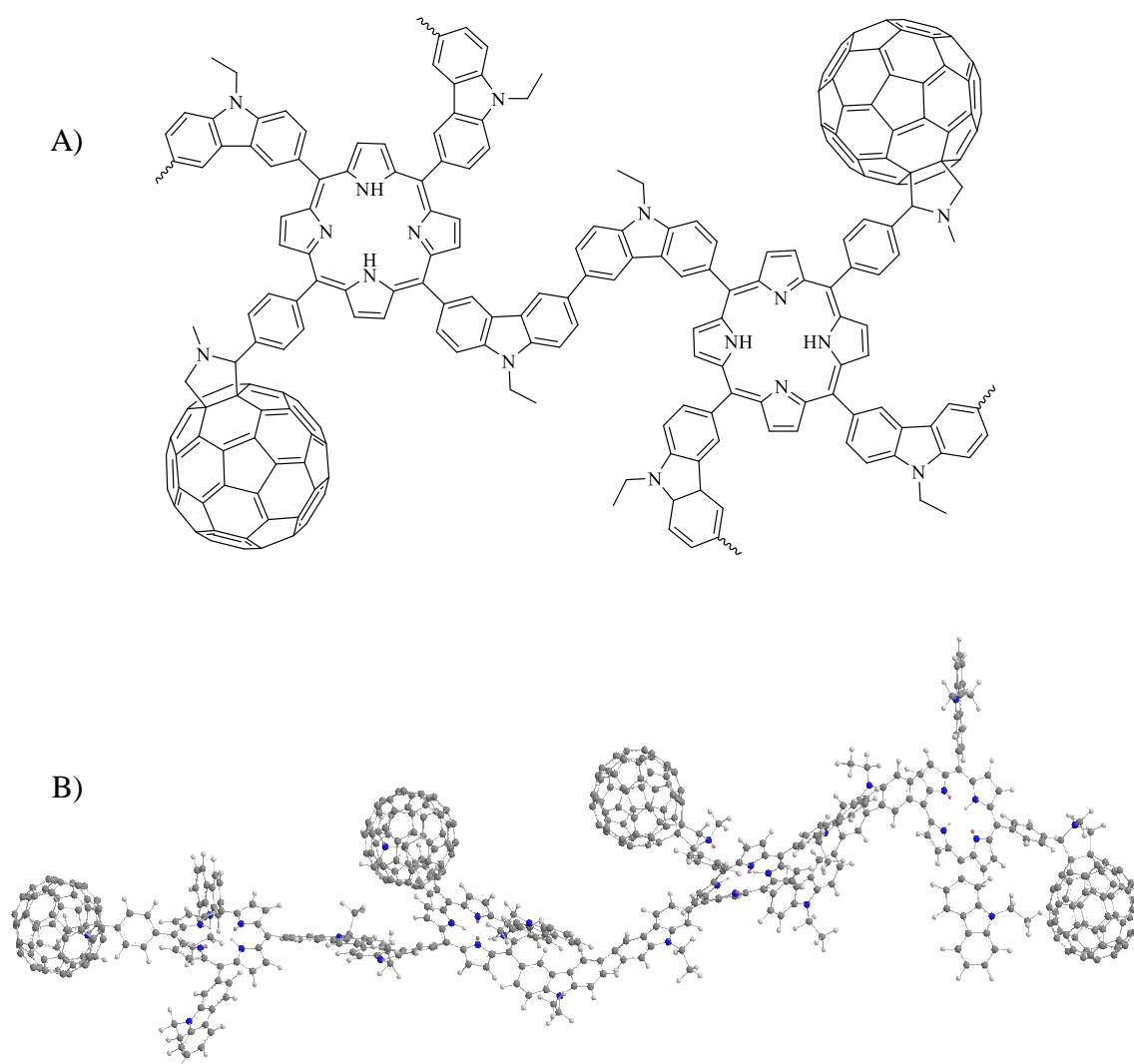
En el Esquema N°71 se observa el polímero de TCP- C_{60} crecido sobre un electrodo de ITO. La distinta coloración en la superficie depende de la concentración de moléculas. Cuanto más oscura es la misma más alta es la absorbancia en la banda *Soret* de cada superficie electropolimérica, lo cual se logra con un mayor número de voltametrías cíclicas continuas a 100 mV/s.



Esquema N°71. Fotografías (A) e imágenes al microscopio (objetivo del microscopio 40x) (B y C) de TCP- C_{60} en distintas concentraciones sobre la superficie del ITO.

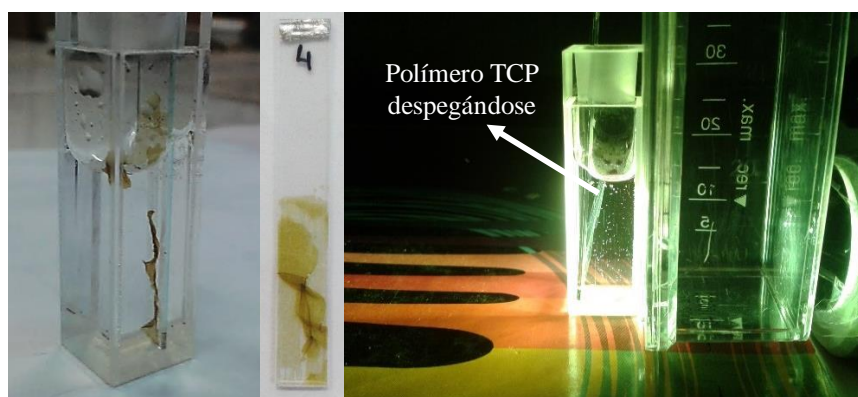
El comportamiento electroquímico observado se puede explicar teniendo en cuenta que TCP- C_{60} tiene tres unidades de carbazol además del grupo C_{60} . Se sabe que la oxidación del carbazol conduce a la dimerización de dos cationes radicales a través de las posiciones 3,3'.³⁹⁹ Así, cada molécula puede formar una red tridimensional, lo que da lugar a la generación de un polímero funcional adsorbido en la superficie del electrodo. La estructura

del polímero formado por TCP-C₆₀ idealizada y la estructura geométrica optimizada con el programa de cálculo AM1 se muestran en los Esquema N°72A y B, respectivamente.



Esquema N°72. (A) Estructura química idealizada del polímero formado por TCP-C₆₀. (B) Estructura geométrica optimizada por AM1 para el polímero TCP-C₆₀.

La capa formada sólo por TCP se llevó a cabo de la misma manera que la descrita por Durantini y col. en el año 2011.³⁹⁹ Sin embargo, el potencial uso de estas superficies poliméricas es la erradicación de microorganismos presentes en agua de consumo o que habitan en superficies de un ambiente hospitalario. En ambos lugares, las películas poliméricas entran en contacto con agua. Es por ello, que las superficies generadas deben ser estables en este solvente polar. Cuando sumergimos el ITO con el polímero formado solamente por TCP en agua, el mismo se despegó de la superficie del ITO (Esquema N°73). Es por ello, que este sistema no se empleó en ninguno de los estudios que se detallan a continuación.



Esquema N°73. Película de TCP despegándose de la superficie cuando se sumerge en agua.

Dado los resultados antes descriptos, se decide construir sobre una película polimérica de TCP previamente electrodepositada una capa formada por TCP- C_{60} ,³⁹⁹ es decir, se obtiene una bicapa polimérica compuesta por: una capa del polímero TCP y otra de TCP- C_{60} . Esta bicapa se ideó teniendo en cuenta la hidrofobicidad del fullereno C_{60} . La Figura N°50, muestra las respuestas de la VC del electropolímero TCP (línea roja) después de diez ciclos de electrodeposición, y la VC de la correspondiente bicapa TCP/TCP- C_{60} después de diez ciclos de electropolimerización de TCP- C_{60} sobre la película del polímero TCP (línea de color negro). La VC obtenida para la primera capa de TCP es similar a la reportada en trabajos previos,³⁹⁹ mientras que en la bicapa es posible observar la contribución a las corrientes farádicas de oxidación-reducción de ambas capas. Dado que las superficies compuestas por TCP- C_{60} y TCP/TCP- C_{60} pueden experimentar estados de transferencia de carga fotoinducidos, se decidió generar un polímero sólo formado por porfirinas en el que también esté presente este fenómeno cuando es irradiado con luz visible. Así, de la misma manera antes desarrollada, se formaron bicapas de TCP/ZnTCP.⁴⁵⁸ Cuando en la superficie polimérica una de las porfirinas está coordinada con el metal Zn, ésta es capaz de transferir carga a la porfirina de base libre. En un trabajo previo, se observó este fenómeno en una solución formada por una díada constituida por dos porfirinas unidas covalentemente, en las que una de ellas está coordinada con Zn(II).²⁴⁶ El macrociclo con el metal tiene en posiciones *meso*, grupos metoxi dadores de electrones y la porfirina base libre está sustituida por grupos nitro aceptores de electrones. Así, se sintetizó una díada con una alta capacidad de producir una transferencia de carga intramolecular que podría ser empleada para la construcción de celdas solares semiconductoras.²⁴⁶

Como se puede observar en la Figura N°50, la formación de la segunda capa de ZnTCP produce un aumento en las corrientes de oxidación-reducción (respecto a la observada para la primera capa) cuando se coloca en una solución que contiene sólo el electrolito soporte.

Esta observación confirma la deposición de la porfirina ZnTCP. A diferencia de la película polimérica formada sólo por TCP, aquella compuesta por la bicapa de porfirinas no se despegue de la superficie del electrodo.

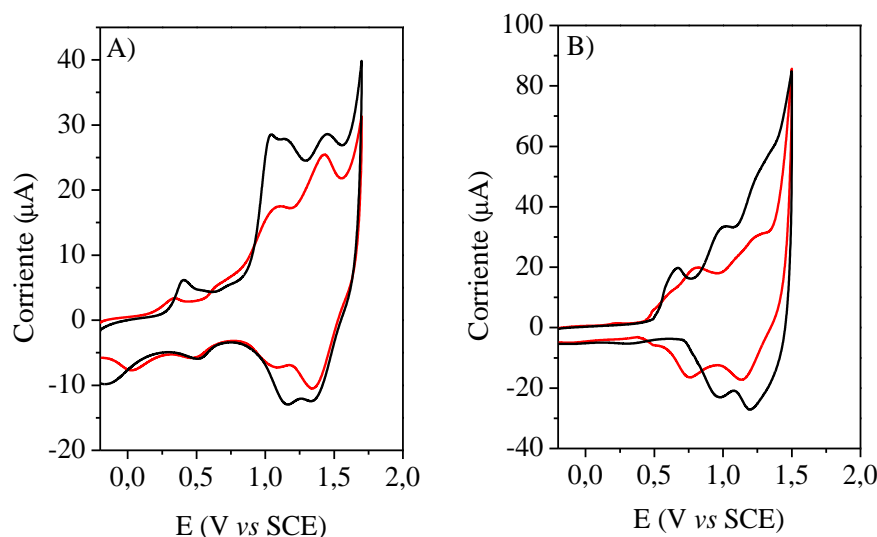
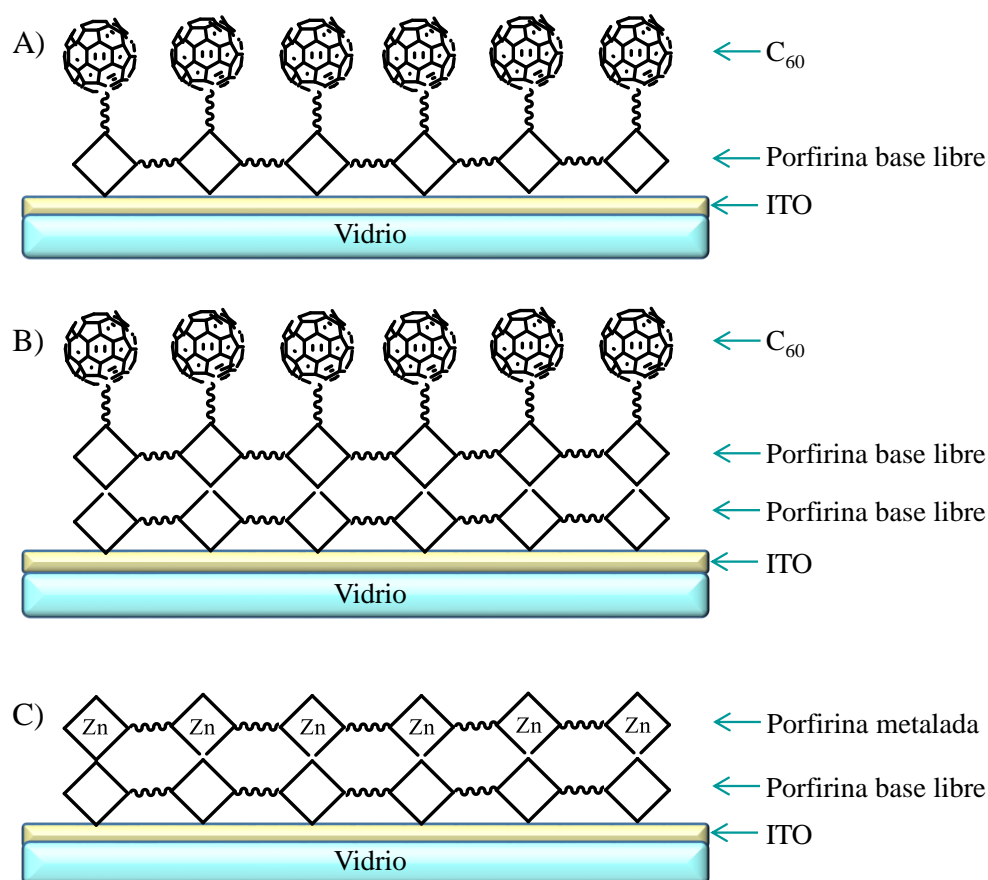


Figura N°50. VC obtenidos como respuesta de las bicapas electropolimerizadas de (A) TCP/TCP- C_{60} , y (B) TCP/ZnTCP en DCE sólo con el electrolito soporte. Las líneas rojas corresponden a la VC luego de la deposición de la primera capa, y las líneas negras luego de la deposición de la segunda capa. Electrodo de trabajo de Pt. Todas las VC se obtuvieron con una velocidad de barrido de 100 mV/s.

Las superficies poliméricas generadas sobre electrodos transparentes de ITO se resumen mediante dibujos representativos en el Esquema N°74. Cabe destacar que no se sabe el modo exacto en cómo están ordenados los polímeros sobre las superficies dado que son tridimensionales e irregulares. Lo que sí se puede confirmar en el caso de las bicapas, es el orden en el cual se hicieron crecer los fotosensibilizadores TCP, ZnTCP y TCP- C_{60} .

Se han propuesto capas electroactivas similares para la construcción de arquitecturas supramoleculares de múltiples componentes adecuadas para la generación eficiente de superficies fotovoltaicas.⁴⁵⁹ En un trabajo previo, se crearon electroquímicamente superficies fotoactivas formadas por polímeros de porfirinas y se analizó el fotovoltaje de superficie transitorio y espectral.⁴⁵⁸ Los valores de fotovoltaje mostraron ser dependientes de la presencia o ausencia del metal Zn(II) el cual está coordinado con las porfirinas que forman la estructura del polímero. Además, los autores observaron un aumento marcado en los valores de fotovoltaje cuando la superficie externa del electropolímero de porfirinas se modificó con una capa de un fuerte aceptor de electrones como lo es el fullereno C_{60} . Así, se mostró que estas superficies podrían ser utilizadas en el desarrollo de nuevas tecnologías de energía solar.⁴⁵⁸ En este trabajo, se obtuvo una bicapa de porfirinas y fullereno C_{60} pero

ambos monómeros no están unidos covalentemente a diferencia de las superficies obtenidas en esta tesis con la díada TCP-C₆₀.



Esquema N°74. Dibujos representativos de las superficies poliméricas formadas por (A) la díada TCP-C₆₀, (B) la bicapa TCP/TCP-C₆₀ y por (C) TCP/ZnTCP.

4.20. Propiedades espectroscópicas

4.20.1. Propiedades espectroscópicas de los polímeros electroquímicos

Los espectros de absorción UV-visible de los distintos fotosensibilizadores empleados para la fabricación de las superficies poliméricas se tomaron en DMF (Figura N°51). La porfirina base libre TCP presenta una banda *Soret* a 432 nm y cuatro bandas *Q* a 524, 563, 600 y 655 nm. Estas son características de porfirinas base libre sustituidas en posición *meso*.⁴⁰² Sin embargo, el espectro de absorción UV-visible para la porfirina coordinada con zinc (ZnTCP) es diferente dado que muestra una banda *Soret* a 437 nm pero presenta dos bandas *Q* en lugar de cuatro, llamadas α y β , en 564 y 607 nm. Cuando las porfirinas forman complejos con metales divalentes, tales como Zn(II), con configuración d^0 o d^{10} , el número de bandas *Q* se reduce a dos y se denotan como α (banda de menor energía) y β (banda de mayor energía).^{8, 10} Generalmente, la banda de menor energía presenta un corrimiento hipsocrómico. Además, la banda *Soret* de la porfirinas coordinadas con un metal suele

correrse entre 2-5 nm hacia el rojo. Los mismos cambios espectroscópicos se observaron con una porfirina, sustituida con tres grupos metoxifenilo en posiciones *meso* y con un grupo catiónico 4-trimetilamoniofenilo, cuando la base libre se coordinó con los metales Zn, Cu y Pd.⁴⁰⁸ Por otro lado, en un trabajo más reciente con fotosensibilizadores coordinados con metales se observaron los mismos corrimientos.⁴⁶⁰ Las moléculas estudiadas fueron 5,10,15-tris(4-metoxifenil)-20-(4-metoxycarbonilfenil)porfirina, 5,10,15-tris(4-metoxycarbonilfenil)-20-(4-metoxifenil)porfirina, 5,10,15-tris(4-metoxifenil)-20-(4-(dimetil-2-aminopentadioato)-carbonilfenil)porfirina, 5,10,15-tris(4-(dimetil-2-aminopentanoiodato)-carbonilfenil)-20-(4-metoxifenil)porfirina. Los autores compararon los espectros de absorción de las bases libres con sus respectivos complejos de Zn y Cu, obteniéndose resultados similares a los presentados en esta tesis doctoral.⁴⁶⁰ En un trabajo previo, se observó que la cantidad de nanómetros que se corre una banda en el espectro de absorción depende del metal que coordina al macrociclo tetrapirrólico. Skwor y col., demostraron que el fotosensibilizador 5,10,15,20-tetrakis(*N*-metilpiridinio-4-il)porfirina coordinado con los metales Zn y Pd, experimenta mayores corrimientos en comparación con la porfirina base libre y aquellas coordinadas con Fe y Cu.⁴⁶¹

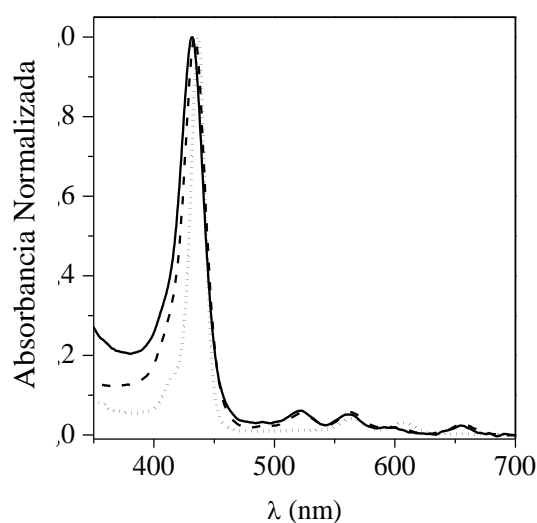


Figura N°51. Espectros de absorción UV-visible de TCP-C₆₀ (línea sólida), TCP (línea de puntos) y ZnTCP (línea punteada) en DMF.

El espectro de absorción de la díada TCP-C₆₀ ha sido ampliamente discutido en la sección 4.2. y se puede observar que la región visible del espectro, es muy similar al de TCP y que aparece una banda a ~330 nm debido a la contribución del fullereno C₆₀.^{275, 277} Los espectros de los tres fotosensibilizadores muestran bandas definidas sin aparición de picos adicionales a los esperados, por lo que se puede decir que estas moléculas en DMF se encuentran principalmente como monómeros.

Los espectros de absorción de las películas poliméricas sobre electrodos de ITO se muestran en la Figura N°52. Todos los espectros se corrigieron teniendo en cuenta la absorción del electrodo transparente ITO.

Conociendo las características espectroscópicas de los fotosensibilizadores en solución, es posible evaluar los espectros de absorción de las moléculas formando polímeros sobre la superficie del ITO. Estas películas muestran las típicas bandas de los derivados de porfirinas sustituidos en posición *meso*, esto es una banda *Soret* a ~440 nm y bandas *Q* entre 515 a 650 nm. Los resultados de la espectroscopia UV-visible confirman la electropolimerización de los derivados de porfirinas sobre el ITO y además, ponen de manifiesto que estos macrociclos tetrapirrólicos polimerizados, tienen similares transiciones electrónicas a las observadas en solución. Sin embargo, las bandas de las porfirinas electropolimerizadas, son más anchas que las correspondientes al fotosensibilizador en estado monomérico en DMF. El máximo de la banda de *Soret* de los derivados de porfirina muestra un corrimiento batocrómico de ~10 nm con respecto a la misma en solución homogénea. Un comportamiento similar se observó previamente para las película generadas por voltametría cíclica empleando derivados de porfirinas que contienen grupos *N,N*-difenilaminofenilos o carbazoles como sustituyentes en posiciones *meso*.^{381,399} Estos hechos indican la existencia de una interacción entre las porfirinas que están formando la estructura de la película hiper-ramificada. Resultados similares se encontraron en superficies poliméricas preparadas con otras porfirinas.^{337,462}

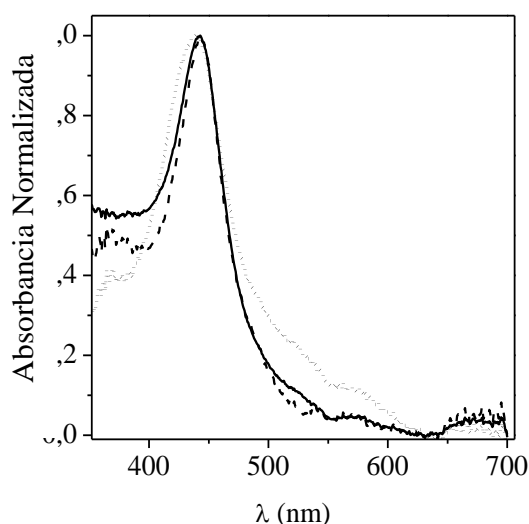
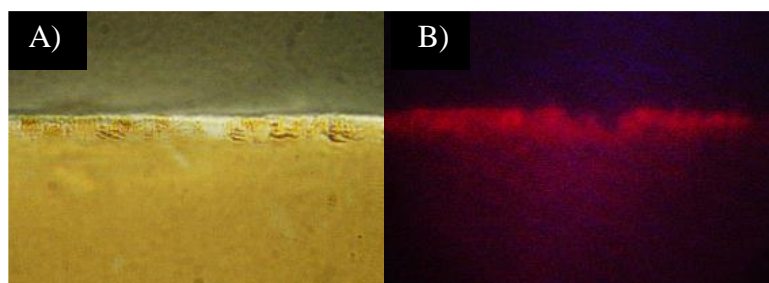


Figura N°52. Espectros de absorción UV-visible de los polímeros TCP-C₆₀ (línea continua), TCP/TCP-C₆₀ (línea discontinua) y TCP/ZnTCP (línea de puntos) corregidos por la absorción del electrodo transparente de óxido de indio y estaño (ITO).

Por otro lado, se tomaron los espectros de emisión de fluorescencia de los polímeros electroquímicos utilizando un porta celda para superficies y excitándolos con distintos ángulos de incidencia y longitudes de onda. Sin embargo, no se observó emisión de fluorescencia por parte de ninguna de las películas estudiadas. Por lo tanto, se decidió observar los polímeros depositados sobre el ITO por microscopia de fluorescencia. En este ensayo, se detectó la emisión roja característica de las porfirinas para la película formada por TCP/ZnTCP sólo en los extremos del polímero (Esquema N°75) donde la electropolimerización es menor y las moléculas se encuentran menos conglomeradas. Además, en esta película existen procesos de transferencia de carga fotoinducidos que disminuyen la emisión de fluorescencia. Las superficies con la díada TCP-C₆₀ no presentan fluorescencia en ninguna parte del polímero. Este hecho se puede explicar teniendo en cuenta que TCP-C₆₀ posee una emisión de fluorescencia muy baja en DMF ($\Phi_F=4,2 \times 10^{-3}$) debido a la desactivación del estado excitado de la porfirina por parte del fullereno C₆₀.⁴⁶³ Cabe destacar, que la fluorescencia de las películas poliméricas, independientemente de la molécula que se emplee para la formación de la misma, puede estar disminuida debido a que en el proceso electroquímico de producción pueden quedar atrapadas sales que producen una desactivación del estado excitado del fotosensibilizador.

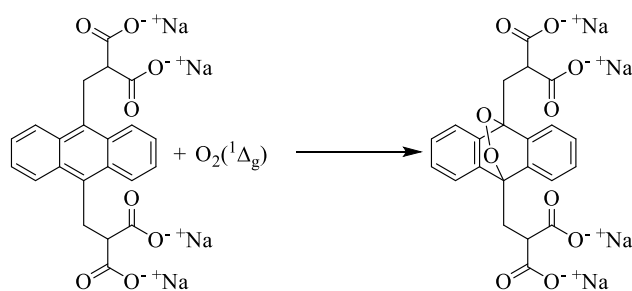


Esquema N°75. Imagen de la superficie formada por la bicapa TCP/ZnTCP sobre ITO. Microscopía de campo claro (A) y microscopía de fluorescencia (B). 40x microscopio objetivo.

4.21. Fotólisis en estado estacionario

4.21.1. Fotooxidación de ABMM

Para detectar la capacidad de las superficies para producir $O_2(^1\Delta_g)$ en agua, se utilizó un derivado del antraceno (ABMM) soluble en este solvente polar, que forma el producto 9,10-endoperoxido (ABMM- O_2) (Esquema N°76).¹⁹³ Por lo tanto, se siguió espectroscópicamente la disminución de la absorbancia de ABMM, el cual es un sustrato que desactiva a $O_2(^1\Delta_g)$ por reacción química exclusivamente.⁴¹⁸ Todas las medidas se llevaron a cabo en condiciones aeróbicas.



Esquema N°76. Reacción de ABMM con $O_2(^1\Delta_g)$.

Los resultados encontrados para las superficies se compararon con los hallados para un fotosensibilizador soluble en agua como lo es la porfirina TPPS⁴⁻, utilizada como molécula de referencia. La interacción electrostática entre la porfirina y el sustrato, puede hacer que no se observen cambios en la absorbancia y por lo tanto se genera un falso negativo en cuanto a la generación de $O_2(^1\Delta_g)$ en agua. Es por ello, que se eligió como referencia una porfirina aniónica para evitar la interacción electrostática con ABMM que posee cuatro cargas negativas.¹⁹³ La fotodegradación de este sustrato, se siguió monitoreando su descomposición a partir de los espectros de absorción UV-visible. En todos los casos estudiados, la fotooxidación sigue una cinética de *pseudo* primer orden a una longitud de onda de 379 nm con respecto a la concentración de ABMM. A partir de los gráficos logarítmicos característicos (Figura N°53), que describen el progreso de la reacción del sustrato, se calcularon los valores de k_{obs} para cada fotosensibilizador (Tabla N°7). El electrodo transparente de ITO sin las películas de porfirina, no produce la descomposición del sustrato ABMM, por lo que no genera cantidades considerables de $O_2(^1\Delta_g)$ en las condiciones del experimento.

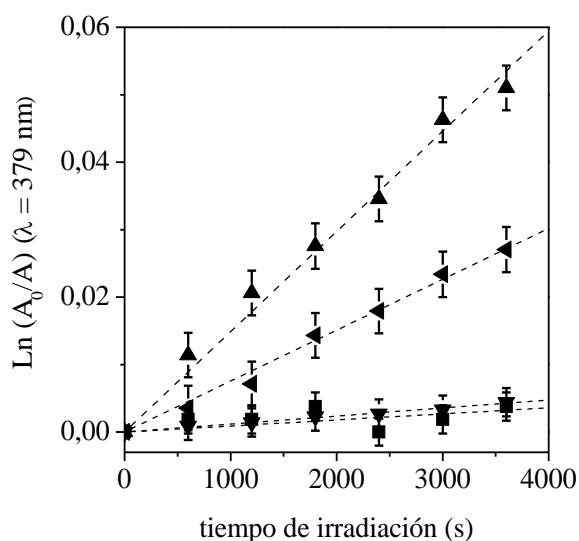


Figura N°53. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de ABMM (35 μ M) fotosensibilizada por los polímeros de TCP- C_{60} (\blacktriangle), TCP/TCP- C_{60} (\blacktriangleleft) y TCP/ZnTCP (\blacktriangledown) depositados sobre ITO y electrodo de ITO (\blacksquare) en agua ($A^{Soret} = 0,1$, $\lambda_{irr} = 455-800$ nm).

Como se puede observar, para la descomposición de ABMM fotosensibilizada por la película TCP-C₆₀ se obtuvo un alto valor de velocidad de reacción. También, la bicapa TCP/TCP-C₆₀ produce una considerable fotooxidación del sustrato. El valor más alto de k_{obs}^{ABMM} se encontró para la reacción fotosensibilizada por TPPS⁴⁻ en solución. Se sabe que esta porfirina presenta un efecto fotodinámico eficiente en agua, con un rendimiento de producción de O₂(¹Δ_g) de 0,74.²⁵² Por el contrario, el valor más bajo de k_{obs}^{ABMM} se obtuvo utilizando la bicapa TCP/ZnTCP. En trabajos previos, se demostró que la electroquímica del sistema ITO/base libre de porfirina/Zn(II) porfirina, es eficiente en la generación de estados de separación de carga fotoinducidos dado que la porfirina metalada actúa como un donante para la porfirina base libre.⁴⁵⁸ No obstante, se produce una rápida recombinación de las cargas fotogeneradas debido a la presencia de la porfirina metalada en la capa exterior. Este efecto puede producir una disminución en la actividad fotodinámica de la película TCP/ZnTCP. Por todo lo antes descrito es posible observar que la superficie formada por TCP-C₆₀, es la más eficiente para generar O₂(¹Δ_g).

Tabla N°7. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de ABMM (k_{obs}^{ABMM}) en agua.

Fotosensibilizador	k_{obs}^{ABMM} (s ⁻¹)	$k_{obs}^{poli}/k_{obs}^{TPPS^{4-}}$ ^a
TCP-C ₆₀ poli	(1,33±0,06)x10 ⁻⁵	0,06
TCP/TCP-C ₆₀ poli	(0,78±0,04)x10 ⁻⁵	0,03
TCP/ZnTCP poli	(0,12±0,01)x10 ⁻⁵	0,01
TPPS ⁴⁻	(2,28±0,09)x10 ⁻⁴	1,00

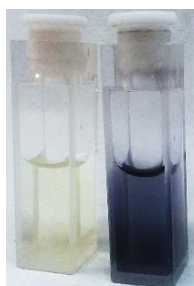
^a Relación para la fotooxidación de ABMM. $A^{Soret} = 0,1$; $\lambda_{irr} = 455-800$ nm.

Distintas superficies antibacterianas pueden construirse a partir del recubrimiento de las mismas con moléculas fotosensibilizadoras capaces de generar O₂(¹Δ_g) cuando se exponen a la luz. El O₂(¹Δ_g) generado puede difundir desde la superficie y destruir a los microorganismos presentes cerca de la misma. Distintos investigadores en diferentes partes del mundo están desarrollando superficies con esta finalidad. En un trabajo previo, se inmovilizó un derivado de *meso*-tetrafenilporfirina (TPP) sobre poliuretano (PU) luego de ser pulverizado y polimerizado como una capa delgada sobre polimetilmetacrilato (PMMA).³⁶³ El PU es permeable al gas y por lo tanto una cantidad suficiente del oxígeno alcanza al fotosensibilizador en este revestimiento. Los autores evaluaron la capacidad de este sistema de generar O₂(¹Δ_g) y su difusión mediante la detección de la luminiscencia del O₂(¹Δ_g) a 1270 nm y a través de un ensayo indirecto que consiste en la medición del tri-

yoduro generado en solución descrito previamente por Mosinger y col.⁴⁶⁴ Ese mismo año, otro grupo de investigadores prepararon películas finas porosas en forma de panal de abeja de tamaño micrométrico de complejos híbridos formados mediante interacción electrostática entre *meso*-tetra(4-sulfonatofenil)porfirina coordinada con Mn(III) (MnTPPS) y bromuro de dimetildioctadecilamonio (DODMABr).³³⁷ Los autores determinaron el $O_2(^1\Delta_g)$ generado por estas películas microporosas empleando la misma metodología utilizada en esta tesis y descrita con anterioridad. Así, las superficies se colocaron en cubetas espectrofluorimétricas por separado, se irradiaron con luz visible ($\lambda > 420$ nm) y se monitoreó la disminución en la absorbancia de 9,10-antracendiilbis(metilen)dimalónico (ABDA) a $\lambda = 401$ nm. Los resultados indican que la intensidad de absorción de ABDA disminuyó gradualmente durante el curso de la iluminación en presencia de las películas microporosas, lo que sugiere que generan $O_2(^1\Delta_g)$.³³⁷ Un año más tarde, Aluigi y col. estudiaron la generación de $O_2(^1\Delta_g)$ por parte de películas de queratina dopadas con azul de metileno.³³⁹ Para tal fin, emplearon el sustrato DMA disuelto en soluciones de DMF con 5 mg de la superficie. Las irradiaciones las llevaron a cabo cada 10 min empleando una lámpara de tungsteno. Los autores observaron la fotooxidación de DMA con una cinética de *pseudo* primer orden, por lo que determinaron un valor de $k_{obs} = (6,18 \pm 0,06) \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ para la superficie con una concentración del fotosensibilizador de 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de queratina.³³⁹ De esta manera, demostraron que las mismas generan $O_2(^1\Delta_g)$ siendo éste uno de los responsables de la muerte celular. Cabe destacar, que el valor de k_{obs} no fue comparado con ninguna referencia, por lo que no se pueden sacar conclusiones adicionales.

4.21.2. Reacción con azul de nitrotetrazolio

Se utilizó la reducción de NBT a DF para detectar la formación de $O_2^{\bullet-}$ en presencia de NADH (Esquema N°62). Bajo condiciones aeróbicas, la descomposición de NBT se produce principalmente a través de un mecanismo de fotorreacción tipo I.²⁹⁴ En agua la solución se torna de color azul y el producto formado precipita (Esquema N°77).



Esquema N°77. Solución con FS, NADH y NBT, antes de irradiar (izquierda) y luego de 60 min de irradiación (derecha).

El aumento de la absorción debido a la producción de DF se siguió a $\lambda=600$ nm en función del tiempo de irradiación. Las superficies o la porfirina TPPS⁴⁻, se estudiaron en 2 ml de agua. La aparición del producto a medida que avanza la reacción, se muestra en la Figura N°54A para la película de TCP-C₆₀. Como se puede observar en la Figura N°54B, no se detectó la reducción de NBT por O₂^{•-} en presencia del electrodo de ITO sin las películas del fotosensibilizador. Se encontró una actividad fotodinámica elevada en presencia de la película TCP-C₆₀. Además, se obtuvo una considerable descomposición de NBT utilizando la bicapa TCP/TCP-C₆₀. Sin embargo, se observó un efecto muy pequeño cuando se empleó la superficie TCP/ZnTCP como agente fotosensibilizante. También, la porfirina TPPS⁴⁻ disuelta en agua produjo O₂^{•-}. Por lo tanto, la superficie TCP-C₆₀ es la más activa para fotosensibilizar la producción de DF. Así, además de producir O₂(¹ Δ_g) desde el estado excitado triplete del fotosensibilizador, se observó que es capaz de generar O₂^{•-} especialmente en presencia de NADH.¹⁶¹

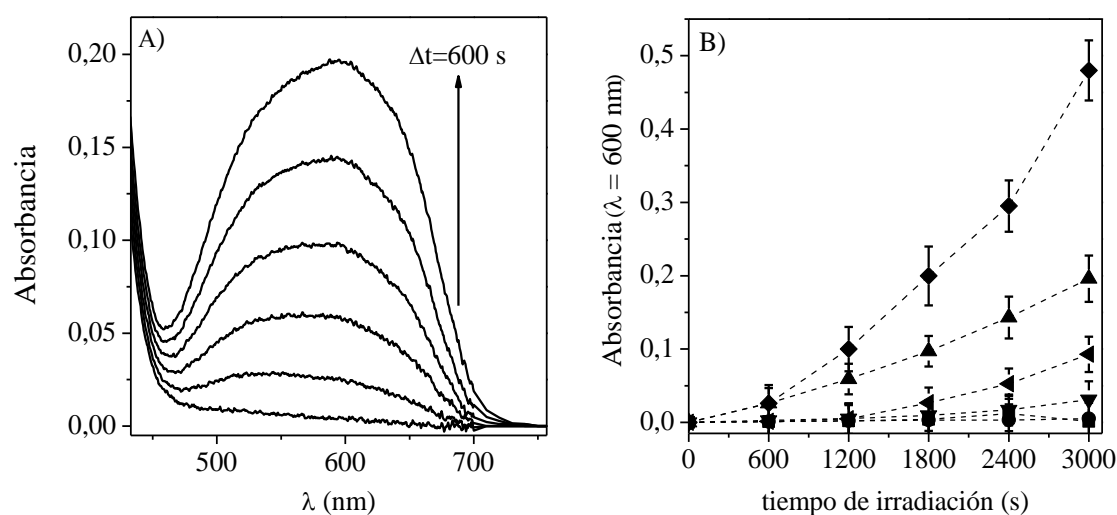


Figura N°54. (A) Aumento de la absorbancia a medida que transcurre el tiempo de irradiación debido a la aparición del producto DF. TCP-C₆₀ poli + NBT + NADH en DMF. (B) Detección de O₂^{•-} mediante la reacción con NBT a diferentes tiempos de irradiación. Polímeros de TCP-C₆₀ (▲), TCP/TCP-C₆₀ (◄) y TCP/ZnTCP (▼) sobre ITO, electrodo de ITO (■) y TPPS⁴⁻ (◆) en agua. ($A_{Soret} = 0,1 - \lambda_{irr} = 455-800$ nm). Control: NBT and NADH (●).

También, se realizaron experimentos control en ausencia de NBT o NADH pero en presencia del fotosensibilizador y sólo con los sustratos NBT y NADH. En los dos primeros casos no hubo producción de O₂^{•-}, mientras que cuando el fotosensibilizador está ausente en el medio de reacción pero están presentes NBT y NADH, se genera una cantidad mínima de este radical. En todos los casos, la presencia de NADH es indispensable para la formación de DF y permite observar el cambio de color característico de esta reacción (Esquema N°77A y B). En todos los estudios de superficies realizados hasta el momento, los autores no

determinan la capacidad de las superficies antibacterianas para generar $O_2^{\bullet-}$. La mayoría de los trabajos investigaron la capacidad de las películas para producir $O_2(^1\Delta_g)$.^{357, 465} Una característica importante de las ROS, es su tiempo de vida media en solución acuosa ($\tau_{1/2}$) dado que cuanto más grande sea este valor, mayor será la capacidad de las ROS de producir reacciones con moléculas de las envolturas celulares de las bacterias. El $\tau_{1/2}$ para el $O_2^{\bullet-}$ varía entre $(1-4) \times 10^{-6}$ s, mientras que $\tau_{1/2}$ para el $O_2(^1\Delta_g)$ es $\sim 4 \times 10^{-6}$ s. Por otro lado, el $O_2(^1\Delta_g)$ posee una alta reactividad con biomoléculas como lípidos y fosfolípidos, aminoácidos (His, Trp, Tyr, Cys y Met) y ácidos nucleicos (guanosina),^{92, 466-467} mientras que el $O_2^{\bullet-}$, no reacciona con el ADN pero si con fosfolípidos. Por lo tanto, ambas ROS son eficientes para la PDI, sin embargo el $O_2(^1\Delta_g)$ posee generalmente un mayor $\tau_{1/2}$ y es más reactivo, por lo que se convierte en la ROS por excelencia.

4.21.3. Fotooxidación de L-triptófano

El Trp se utilizó para analizar la eficiencia de las superficies antibacterianas para generar ROS, debido a que puede ser fotooxidado eficientemente por un mecanismo de reacción tipo I o II (Esquema N°17).¹⁹³ El efecto fotodinámico se analizó en agua siguiendo la descomposición del aminoácido a través de la disminución en su emisión de fluorescencia a $\lambda = 352$ nm. Esta reacción sigue una cinética de *pseudo* primer orden con respecto a la concentración de Trp (Figura N°55). A partir del ajuste lineal de gráficos de $\ln(I_0/I)$ en función del tiempo, se calcularon los valores de k_{obs}^{Trp} para la descomposición del sustrato fotosensibilizada por las distintas superficies. Los resultados se muestran en la Tabla N°8.

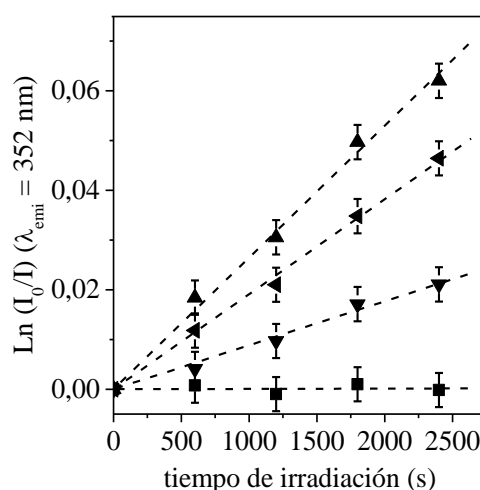


Figura N°55. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de Trp (20 μ M) fotosensibilizada por los polímeros de TCP-C₆₀ (▲), TCP/TCP-C₆₀ (◄) y TCP/ZnTCP (▼) sobre ITO, electrodo de ITO (■) y TPPS⁴⁻ (◆) en agua ($A^{Soret} = 0,1$; $\lambda_{irr} = 455-800$ nm).

Comparando los valores de k_{obs}^{Trp} , se encontró que la película TCP-C₆₀ produce la mayor descomposición del sustrato comparada con las otras superficies. También, la bicapa TCP/TCP-C₆₀ produjo una considerable fotooxidación del Trp. En este caso, al igual que lo encontrado con el sustrato ABMM, la superficie que presenta la menor actividad fotodinámica es la formada por TCP/ZnTCP. En esta película, el macrociclo tetrapirrólico está directamente implicado en la formación del polímero y la rápida recombinación de las cargas da lugar a una competencia entre los procesos de relajación en la red polimérica desde el estado excitado triplete, produciendo la disminución de la actividad fotodinámica. En contraste, las películas formadas por la díada TCP-C₆₀ tienen unidades de fullereno que se unen al polímero mediante un anillo de pirrolidina. Por lo tanto, estas estructuras se encuentran más libres y alejadas de la superficie con respecto a las porfirinas. Es así, que el fullereno C₆₀ puede producir eficientemente ROS actuando la porfirina como una antena captadora de energía.

Tabla N°8. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de Trp (k_{obs}^{Trp}) en agua.

Fotosensibilizador	k_{obs}^{Trp} (s ⁻¹)	$k_{obs}^{poli}/k_{obs}^{TPPS^{4-}}$ b
TCP-C ₆₀ poli	(2,59±0,05)x10 ⁻⁵	0,10
TCP/TCP-C ₆₀ poli	(1,91±0,03)x10 ⁻⁵	0,07
TCP/ZnTCP poli	(0,88±0,05)x10 ⁻⁵	0,03
TPPS ⁴⁻	(2,87±0,03)x10 ⁻⁴	1,00

^arelación para la fotooxidación de Trp. A^{Soret} = 0,1; λ_{irr} = 455-800 nm.

Como se puede observar en la Tabla N°8, la relación entre las $k_{obs}^{poli}/k_{obs}^{TPPS^{4-}}$ para la descomposición de Trp mediada por las películas, es mayor a la obtenida para la fotooxidación de ABMM en agua. Además, los valores más altos de k_{obs} se obtuvieron cuando la descomposición del Trp se llevó a cabo por superficies que contienen fullerenos C₆₀. Por lo tanto, es posible que además del mecanismo de fotorreacción tipo II, que implica la generación de O₂(¹Δ_g), esté actuando el fotoproceso tipo I, que involucra una vía de transferencia de electrones, lo que queda en evidencia con el ensayo de NBT (sección 4.21.2.).

La red de porfirinas en la superficie de TCP-C₆₀, absorbe la luz visible y puede llevar a cabo dos procesos, o transfiere la energía al fullereno C₆₀ o produce un estado de separación de cargas fotoinducido (P^{•+}-C₆₀^{•-}). Por lo tanto, la porfirina en la díada actúa como una antena. El fullereno C₆₀, una vez en su estado excitado triplete (³C₆₀^{*}) puede interactuar con

el oxígeno molecular en estado fundamental ($O_2(^1\Sigma_g)$) para formar ROS. Por un lado, puede ocurrir una transferencia de energía desde el $^3C_{60}^*$ al $O_2(^3\Sigma_g)$ para producir $O_2(^1\Delta_g)$. También, puede existir una transferencia de electrones al $O_2(^3\Sigma_g)$ para formar $O_2^{\cdot-}$. Se sabe que los fullerenos generan de manera muy eficiente $O_2(^1\Delta_g)$, con un rendimiento cuántico cercano a la unidad.¹⁹⁷ Por otro lado, los C_{60} pueden reducirse para formar su radical anión ($C_{60}^{\cdot-}$).³⁰⁴ Es por ello, que $^3C_{60}^*$ y $C_{60}^{\cdot-}$ pueden transferir un electrón al $O_2(^3\Sigma_g)$ para producir $O_2^{\cdot-}$. La transferencia de electrones tiene lugar principalmente en un medio polar y en la presencia de agentes reductores, tales como el NADH. Así, en aquellas películas formadas por la díada TCP- C_{60} , pueden estar compitiendo los dos mecanismos de reacción fotoinducidos para producir de manera eficiente ROS. Resultados previos mostraron que mediante voltametría cíclica se generan heterouniones poliméricas entre porfirinas base libre y películas de fullereno C_{60} , y que estas son capaces de producir un estado de separación de carga fotoinducido.⁴⁵⁸⁻⁴⁵⁹ La deposición de una capa de fullereno C_{60} sobre otra formada por porfirinas, presentaron una separación de electrones en dirección a la superficie externa, mientras que los huecos (h^+) se encuentran en la película interna de porfirina.⁴⁵⁹ Por tales motivos, las superficies de TCP- C_{60} son capaces de formar un estado de separación de carga fotoinducido y tener una actividad fotodinámica considerable debido a la contribución de ambos procesos fotoquímicos para producir ROS.

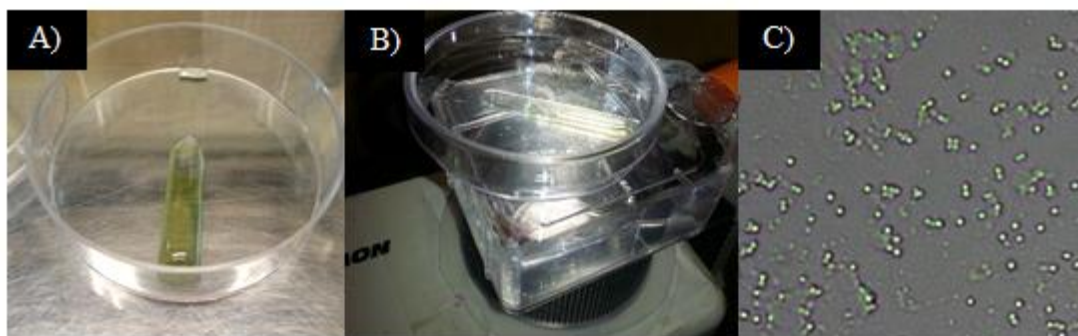
En un trabajo previo, Funes y col. estudiaron la capacidad de películas poliméricas generadas electroquímicamente formadas por la porfirina 5,10,15,20-tetra(4-*N,N*-difenilaminofenil)porfirina (sup- H_2P) y su complejo con Pd(II) (sup-PdP).³³⁸ Soluciones en agua con el aminoácido Trp y las películas (absorbancia en la banda *Soret* de 0,2) se irradiaron con luz visible (λ_{irr} =370-800 nm). Ambas superficies poliméricas mostraron fotooxidar eficientemente al Trp con valores de $k_{obs}=(0,7\pm0,3)\times10^{-4} s^{-1}$ y $k_{obs}=(1,0\pm0,3)\times10^{-4} s^{-1}$ para sup- H_2P y sup-PdP, respectivamente.³³⁸ Por lo tanto, ambos polímeros podrían emplearse como superficies antimicrobianas.

4.22. Estudios con microorganismos

4.22.1. Inactivación de *S. aureus* sobre superficies electropolimerizadas

La acción fotodinámica inducida por las películas poliméricas se comparó *in vitro* para inactivar células de *S. aureus*. La fotoinactivación de este microorganismo se investigó depositando una gota con células sobre las películas poliméricas. Se empleó la metodología I (sección 3.14.1.) para evaluar la capacidad de las superficies poliméricas de inactivar células bacterianas que contaminan una superficie.³⁹⁻⁴⁰ Por lo tanto, se colocó una gota de

250 μl de PBS ($\sim 1 \times 10^4$ UFC/ml) sobre las películas poliméricas y se irradiaron con luz visible como se muestra en el Esquema N°78. Los estudios se llevaron a cabo sin evaporar el agua antes de la irradiación.



Esquema N°78. (A) Polímero electroquímico con una gota de 250 μl de PBS con $\sim 1 \times 10^4$ UFC/ml de *S. aureus* (B) Sistema de irradiación para inactivar *S. aureus* sobre la superficie. (C) Imagen al microscopio de colonias de *S. aureus* en la gota sobre la superficie del polímero TCP-C₆₀ (objetivo del microscopio 100x).

La Figura N°56 muestra la supervivencia de las células bacterianas después de diferentes tiempos de irradiación. Los experimentos control indican que la viabilidad de *S. aureus* no se ve afectada por la irradiación con luz visible cuando se coloca una gota de células sobre el ITO sin polimerizar, o cuando se mantienen las superficies con el fotosensibilizador en la oscuridad durante 60 min (estos resultados no se muestran). Por lo tanto, la inactivación de las células de *S. aureus* luego de la irradiación, se produce por el efecto fotosensibilizante de las películas poliméricas. Después de irradiar durante 30 min los dos polímeros que contienen la díada (TCP-C₆₀ y TCP/TCP-C₆₀, $A^{Soret}=0,1$), no se detectaron células viables. Este resultado corresponde a una disminución en la supervivencia celular de $\sim 99,97\%$. Por lo tanto, películas poliméricas formadas por TCP-C₆₀ resultan útiles para inactivar *S. aureus* cuando son irradiadas. Por el contrario, se observó una baja actividad fotodinámica con la bicapa TCP/ZnTCP incluso utilizando una superficie con una mayor absorbancia ($A=0,3$) en la banda de *Soret*. Este resultado, está de acuerdo con los encontrados en medio homogéneo al estudiar la actividad fotodinámica de TCP/ZnTCP empleando distintos sustratos tales como ABMM, NBT/NADH y Trp (Sección 4.21.). Por lo tanto, de los resultados encontrados hasta el momento se puede decir que para que la superficie presente una actividad antibacteriana considerable es necesario que posea capas de TCP-C₆₀.

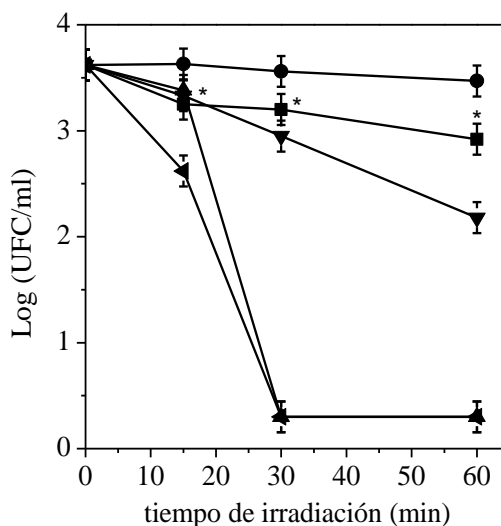


Figura N°56. Supervivencia de *S. aureus* ($\sim 10^4$ UFC/ml) depositando una gota (250 μ l) con las células sobre los polímeros de TCP-C₆₀ (▲), TCP/TCP-C₆₀ (◄) y TCP/ZnTCP ($A^{Soret} = 0,3$) (▼) sobre ITO y el electrodo de ITO (■). Las células se expusieron a la luz visible durante diferentes tiempos de irradiación. Control: células irradiadas sobre el ITO sin polímero (●) (* $p < 0.05$, comparado con el control).

En un trabajo previo, se emplearon superficies de poliuretano y metilmetacrilato dopadas con porfirinas para la inactivación fotodinámica de *S. aureus*.³⁶³ Los estudios se llevaron a cabo con diferentes concentraciones del fotosensibilizador y durante distintos tiempos de irradiación. Para estos estudios, los autores depositaron una gota de 50 μ l con la suspensión de *S. aureus* con una densidad celular de $\sim 10^7$. Luego, se evaporó el agua dejando las superficies 1,5 h bajo la campana de flujo laminar. Cada gota dio lugar a un área con microorganismos de 0,8 cm². Las superficies se irradiaron con una potencia de 50 mW cm⁻². En estas condiciones, se observó una disminución en la supervivencia celular del 99,9% (lo que corresponde a una disminución de ~ 3 log) luego de 30 min de irradiación.³⁶³ Cuando una superficie da lugar a una baja en la viabilidad celular del 99,9% (~ 3 log), se considera que su actividad antimicrobiana es biológicamente relevante de acuerdo con las directrices de higiene de manos.⁴⁶⁸

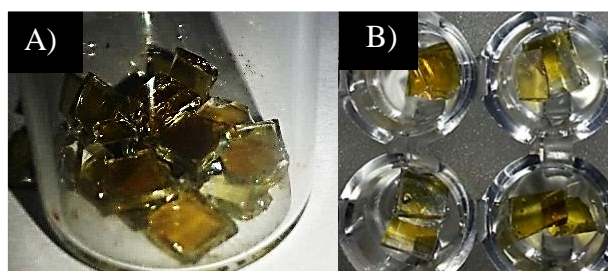
Otros autores emplean polímeros naturales para la construcción de superficies antimicrobianas. En este caso, se reportó un trabajo en el que usaron fibras de celulosa con 5,10,15,20-tetrakis(4-*N,N,N*-trimetilnilina)porfirina y su complejo con Zn, para preparar polímeros antimicrobianos.³⁵⁶ La capacidad para la PDI de estos materiales se probó con *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*. Las mismas se irradiaron con luz visible empleando diferentes tiempos de irradiación y concentraciones de los fotosensibilizadores. Los autores emplearon un antibiograma para los ensayos. Los resultados muestran que luego de 90 min

de irradiación se logra una reducción de la supervivencia de *S. aureus* del 12,7% mientras que con los otros microorganismos no se ve un efecto significativo.³⁵⁶

4.22.2. Inactivación de *S. aureus* y *E. coli* con superficies antimicrobianas

Se examinó la capacidad de las películas poliméricas para inactivar suspensiones celulares de *S. aureus* en PBS empleando la metodología II para superficies descrita en la sección 3.14.2. Con tal fin, se utilizaron porciones cuadradas de superficie (Área=0,3x0,3=0,09 cm²) (Esquema N°79A), las cuales se cortaron con un corta vidrio una vez formadas las películas sobre el ITO con voltametría cíclica.

Para la experiencia, se utilizó una policubeta de 96 pocillos y en cada pocillo se colocó 150 µl de la suspensión celular de *S. aureus* en PBS (~10⁴ UFC/ml) y dos superficies pequeñas (Esquema N°79B). Luego, se irradió el sistema con luz visible durante diferentes períodos de tiempo. Los resultados se muestran en la Figura N°57.



Esquema N°79. (A) Pequeñas porciones cuadradas de superficie antimicrobiana. (B) Pequeñas superficies poliméricas dentro de la poli cubeta de 96 pocillos con 150 µl de la suspensión celular de *S. aureus* en PBS (~10⁴ UFC/ml).

Los experimentos control indican que la viabilidad de *S. aureus* no se ve afectada por la irradiación con luz visible cuando se colocan dos superficies pequeñas de ITO sin polimerizar, o cuando se mantienen las superficies con el fotosensibilizador en la oscuridad durante 60 min (estos resultados no se muestran). Como se puede observar en la Figura N°57, la inactivación de los microorganismos se produce cuando las películas poliméricas son expuestas a la luz visible. La bicapa TCP/TCP-C₆₀ produjo una disminución de 2 log en la viabilidad de *S. aureus* después de 30 min de irradiación. Un resultado similar se obtuvo con la película que sólo contiene TCP-C₆₀, pero resultó ser más efectiva dado que se logró la misma inactivación pero con un tiempo de iluminación más corto (20 min). Además, cuando esta superficie se irradió durante 30 min, se produjo una disminución en la viabilidad celular de 3,5 log, lo que corresponde a un 99,96% de fotoinactivación celular. Por lo tanto, la PDI mediada por la película polimérica TCP-C₆₀ es más eficaz que la producida por la bicapa TCP/TCP-C₆₀. Por otro lado, el polímero de porfirinas TCP/ZnTCP ($A^{Soret} = 0,1$) presenta

una menor actividad antibacteriana en comparación con las dos películas que contienen la díada TCP-C₆₀. Este resultado está de acuerdo con los datos de actividad fotodinámica obtenidos en medio homogéneo con distintos sustratos (secciones 4.21.1; 4.21.2; 4.21.3.). Sin embargo, cuando la absorbancia de la bicapa TCP/ZnTCP se aumentó a 0,8 en la banda *Soret* y se irradió durante 30 min, se obtuvo una disminución de 3,5 log en la supervivencia de las células de *S. aureus* la cual es muy similar a la obtenida con TCP-C₆₀ con una absorbancia de 0,1 en su banda *Soret*.

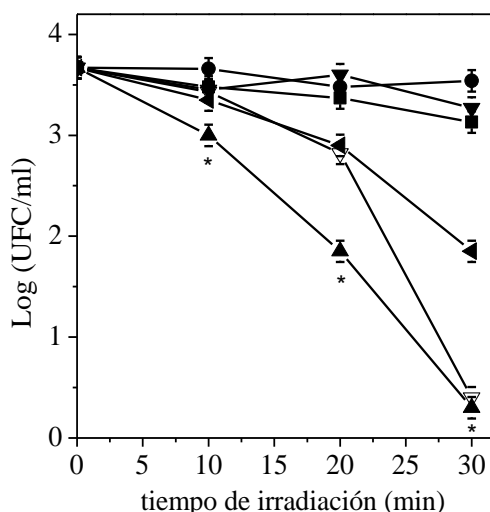


Figura N°57. Supervivencia de *S. aureus* ($\sim 10^4$ UFC/ml) en PBS fotosensibilizada por los polímeros TCP-C₆₀ (▲), TCP/TCP-C₆₀ (◄), TCP/ZnTCP (▼) y TCP/ZnTCP ($A^{Soret} = 0,8$) (▽) sobre ITO y el electrodo de ITO solo (■). Las células se expusieron a la luz visible durante diferentes tiempos de irradiación. En todos los casos, la $A^{Soret} = 0,1$ excepto cuando se indica lo contrario. Control: células irradiadas sobre el ITO sin polímero (●) (* $p < 0,05$, comparado con el control).

Se sabe que las bacterias Gram positivas son más fáciles de inactivar por PDI que las Gram negativas debido a diferencias significativas en la estructura de sus paredes celulares.⁴⁶⁹ Por lo tanto, para evaluar la eficiencia de la película de TCP-C₆₀ para inactivar una bacteria Gram negativa, se llevó a cabo la inactivación de *E. coli* siguiendo la metodología descrita anteriormente. Este microorganismo se encuentra comúnmente en aguas residuales de origen doméstico, siendo un indicativo de contaminación fecal en agua.⁴⁷⁰ Para probar la eficacia de las superficies poliméricas para la erradicación de *E. coli*, se eligió aquella película que dio los mejores resultados de PDI con la bacteria Gram positiva *S. aureus*. La superficie formada por la díada TCP-C₆₀ inactivó el mayor número de microorganismos, en el menor tiempo y con una baja absorbancia en su superficie. Es por ello, que fue la elegida para los estudios que se detallan a continuación.

En presencia de la película TCP-C₆₀, se obtuvo una disminución de la viabilidad celular de 0,7 log cuando es irradiada con luz visible durante 30 min (Figura N°58). La

membrana externa de las bacterias Gram negativas forma una barrera de permeabilidad entre la célula y el medio circundante, lo que restringe la penetración de las ROS y por lo tanto vuelve a esta bacteria difícil de inactivar.⁴⁶⁹ Así, para obtener una disminución en la supervivencia celular de ~ 4 log, se irradió el polímero TCP-C₆₀ durante 60 min. Estos resultados corresponden a una inactivación celular del 99,98%. Cabe destacar, que se tomó un espectro de absorción, luego de irradiar las superficies durante 60 min, que mostró que las suspensiones celulares no estaban contaminadas con los fotosensibilizadores empleados para la formación de las películas. Por lo tanto, no hay fotosensibilizador libre en PBS que pueda ser el responsable de la PDI.

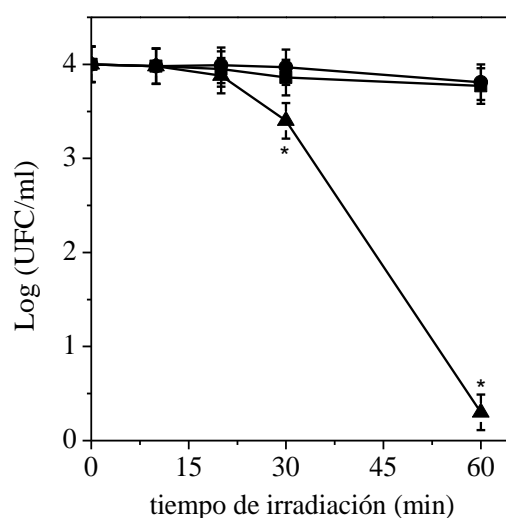


Figura N°58. Supervivencia de *E. coli* ($\sim 10^4$ UFC/ml) en PBS fotosensibilizada por el polímero TCP-C₆₀ ($A^{Soret} = 0,1$) (▲) sobre ITO y el electrodo de ITO (■). Las células se expusieron a la luz visible durante diferentes tiempos de irradiación. Control: células irradiadas sobre el ITO sin polímero (●) (* $p < 0,05$, comparado con el control).

En estudios previos, se formaron películas por polimerización electroquímica de 5,10,15,20-tetra(4-*N,N*-difetilaminofenil)porfirina y de su complejo con Pd(II) sobre electrodos de ITO.³³⁸ Estas superficies presentan actividad fotosensibilizante contra células de *E. coli* y *C. albicans*, dos microorganismos difíciles de erradicar. Por otro lado, una serie de complejos de ftalocianinas de baja simetría, soportados sobre una fibra de polímero, presentó actividad antimicrobiana contra *S. aureus*.⁴⁷¹ Además, se sintetizaron los fotosensibilizadores Pb(II) piridiloxifalocianina (PbTpyPc) y su forma cuaternizada (PbTepypc) y se incorporaron en fibras de poliestireno. Estas superficies resultaron eficientes para inactivar la bacteria *E. coli* cuando son irradiadas con luz visible.⁴⁷²

En la presente investigación, las superficies se iluminaron con luz visible con el objetivo de inactivar bacterias Gram positivas y Gram negativas. Los dos cromóforos que conforman a TCP-C₆₀ se pueden excitar y producir ROS. Los fullerenos C₆₀ son eficaces en

producir ROS mediante el mecanismo fotoquímico tipo I, en oposición a la generación de $O_2(^1\Delta_g)$ que predomina en las porfirinas.¹⁸⁶ Como se mencionó con anterioridad, la díada polimerizada puede generar un estado de separación de carga fotoinducido lo que contribuye a la generación de ROS para la inactivación de los microorganismos. En las películas que contienen la díada TCP- C_{60} , la estructura del fullereno C_{60} no está directamente involucrada en la formación del polímero, por lo que dicha molécula se encuentra más libre y alejada de la superficie del ITO. Se sabe que los derivados del fullereno C_{60} son fotosensibilizadores eficaces para inactivar microorganismos.¹⁶¹ Además, estas estructuras son más fotoestables que los macrociclos tetrapirrólicos.²⁶⁷

4.23. Reutilización de superficies poliméricas para la PDI de bacterias

De todas las superficies poliméricas estudiadas hasta el momento, la más eficiente para erradicar tanto *S. aureus* como *E. coli*, resultó ser la formada por TCP- C_{60} . Es por ello, que se evaluó su estabilidad fotoquímica, irradiando la misma en 2 ml de PBS con la bacteria Gram positiva *S. aureus*. La concentración de células empleadas fue de $\sim 1 \times 10^4$ UFC/ml, la misma que la utilizada para los experimentos de PDI (secciones 4.22.1. y 4.22.2.). La Figura N°59, muestra que existe un fotoblanqueo de la superficie el cual aumenta con el incremento en el tiempo de irradiación. Esto puede deberse a que las ROS generadas, no sólo interactúan con las membranas de las bacterias sino que además algunas de ellas, destruyen el polímero electroquímico orgánico de la superficie del ITO. Por lo tanto, dado los buenos resultados obtenidos con dicha película, sería necesario un desarrollo ingenieril para lograr una superficie estable a la luz en el tiempo.

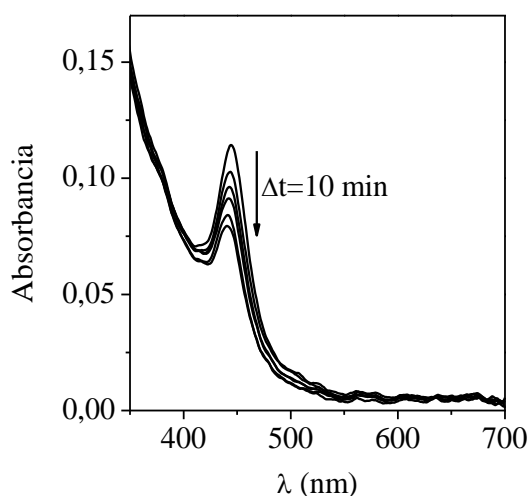


Figura N°59. Fotoblanqueo de la superficie polimérica TCP- C_{60} en solución de PBS con *S. aureus* ($\sim 1 \times 10^4$ UFC/ml). $\lambda_{irr} = 455-800$ nm.

Luego de los estudios de espectroscopia de absorción, se comprobó la estabilidad y la citotoxicidad del fotosensibilizador TCP-C₆₀ electropolimerizado para inactivar *S. aureus* ($\sim 1 \times 10^4$ UFC/ml) luego de usos repetidos. Para tal fin, se repitió el tratamiento de PDI con la bacteria Gram positiva tres veces en las mismas condiciones experimentales de inactivación en la cuales se desarrollaron los ensayos de PDI. Se siguió la metodología I descripta en la sección materiales y métodos. Los resultados muestran que la eficiencia de la PDI se ve disminuida con las repeticiones. Así, la capacidad del polímero TCP-C₆₀ para erradicar *S. aureus* descendió en ~ 1 log luego de la tercera utilización (Figura N°60). Esto puede deberse, al efecto de fotoblanqueo que ejercen las ROS generadas por la luz visible empleada como fuente de irradiación.

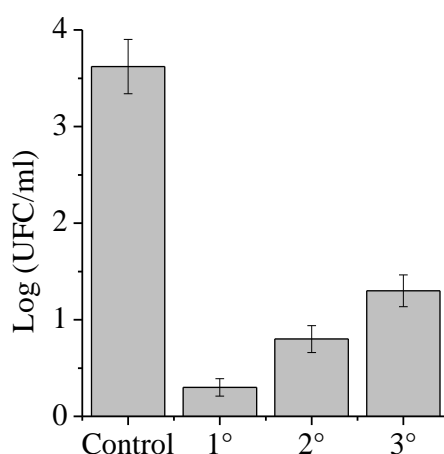


Figura N°60. Resultados de la reutilización de la superficie polimérica TCP-C₆₀ para la PDI de *S. aureus* ($\sim 1 \times 10^4$ UFC/ml) empleando la metodología I. $\lambda_{irr} = 350-800$ nm.

4.24. Una nueva visión para la construcción de superficies antimicrobianas

En la sección 4.19, se describe la construcción de distintas superficies antibacterianas las cuales se obtuvieron mediante voltametría cíclica en el rango de potenciales oxidativos. Se emplearon los fotosensibilizadores: TCP, ZnTCP y TCP-C₆₀. Los mismos se combinaron de manera estratégica para obtener polímeros con distintas características. Así, se construyeron electroquímicamente tres superficies: una formada por la bicapa TCP/ZnTCP, otra por TCP/TCP-C₆₀ y una tercera constituida sólo por la diáda TCP-C₆₀. Todas ellas, tienen la capacidad de formar un estado de separación de carga fotoinducido y por lo tanto, la posibilidad de actuar mediante un mecanismo fotodinámico tipo I y tipo II. Sin embargo, no se pudieron realizar estudios de fotoinactivación con los polímeros de TCP o ZnTCP, debido a que cuando se los sumerge en PBS se despegan del soporte de ITO (Esquema N°73). A las tres superficies antes descriptas se les evaluó su capacidad para inactivar *S. aureus* y *E. coli* en estado planctónico o flotante libre, mediante dos metodologías diferentes,

una orientada a la desinfección de superficies y otra de agua residual. De esta manera, se evaluó el potencial de las superficies para inactivar tanto una bacteria Gram positiva como una Gram negativa. Los mejores resultados se obtuvieron con el soporte sólido con el polímero TCP-C₆₀, logrando una inactivación de ~99,97% de ambos tipos de microorganismos. Sin embargo, estas superficies poseen ciertas desventajas. Por un lado, las moléculas TCP, ZnTCP y TCP-C₆₀ son difíciles de electropolimerizar sobre la superficie del ITO por lo que no se alcanzan altas absorbancias del polímero. Por otro lado, aquellas superficies formadas por TCP y ZnTCP no son estables mecánicamente, cuando se sumergen en agua el polímero se despegue de la superficie del ITO. Además, no resisten lavados con alcohol etílico y se deben manipular con cuidado, dado que el roce con otros materiales también despegue la película de la superficie del vidrio. Es por ello, que se decidió sintetizar una nueva porfirina con simetría *trans*-A₂B₂ con dos grupos diferentes en posiciones *meso*, ambos capaces de electropolimerizar. Así, este fotosensibilizador está formado por los sustituyentes trifenilamina y carbazol. Esta molécula, pertenece a la familia de compuestos con los que se venía trabajando, dado que es un macrociclo tetrapirrólico con dos sustituyentes carbazol en posiciones *meso* que son común a TCP, ZnTCP y TCP-C₆₀. Esta nueva porfirina llamada CBZTPA, se electrodeposita sin inconvenientes sobre la superficie del ITO alcanzando altas absorbancias ($A \sim 1$) y dando lugar a un sistema muy estable desde un punto de vista mecánico. Por otro lado, se coordinó la díada TCP-C₆₀ con el metal Zn con el objetivo de obtener polímeros en los cuales la formación del estado de separación de carga fotoinducido se vea favorecido y por lo tanto, para que exista un aporte significativo en la generación de ROS del mecanismo tipo I. Esta hipótesis está basada en datos bibliográficos pertinentes.^{304, 381} De esta manera, se construyeron superficies con la díada ZnTCP-C₆₀ y se evaluó su actividad fotodinámica y antimicrobiana.

4.25. Obtención de nuevos polímeros antibacterianos

Los fotosensibilizadores 5,15-bis[4(-*N,N*-difenilamino)fenil]-10,20-bis[3-(*N*-etilcarbazol)]porfirina (CBZTPA) y Zn(II) 5,15-bis[4(-*N,N*-difenilamino)fenil]-10,20-bis[3-(*N*-etilcarbazol)]porfirina (ZnCBZTPA) se sintetizaron como se describe en trabajos previos.^{338, 381} La díada TCP-C₆₀ se disolvió en DCM y se metaló empleando una solución saturada de acetato de zinc en metanol. Luego de una hora de reacción en atmósfera inerte, se obtuvo la díada de interés ZnTCP-C₆₀. De esta manera, mediante un paso de síntesis sencillo y rápido es posible coordinar el macrociclo tetrapirrólico con el metal divalente y

obtener un fotosensibilizador con mejores propiedades fotodinámicas. El mismo paso de síntesis se llevó a cabo en trabajos previos con otras moléculas.^{243, 301}

Se empleó voltametría cíclica para la generación de las nuevas superficies fotoactivantes formadas por ZnTCP-C₆₀. La Figura N°61 muestra los voltamogramas cíclicos de la díada en solución de *o*-DCB con TBAP como electrolito soporte utilizando un electrodo de trabajo de Pt.

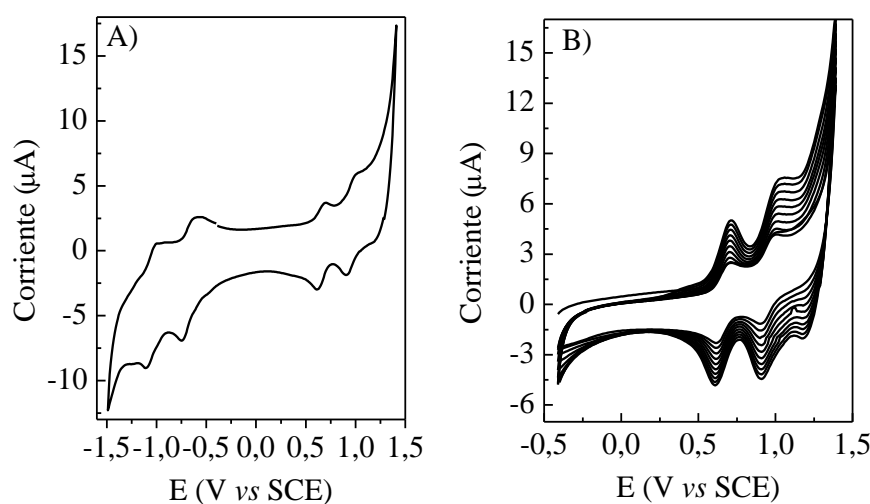


Figura N°61. (A) Primer barrido anódico y catódico de ZnTCP-C₆₀. (B) Diez ciclos de VC tomados en *o*-DCB con TBAP como electrolito soporte utilizando Pt como electrodo de trabajo. Todas las VC se obtuvieron con una velocidad de barrido de 100 mV/s.

Como puede verse, los dos primeros procesos de oxidación son reversibles y no se observan cambios en las corrientes de Faraday durante el ciclo continuo, solamente han sido afectadas por la difusión. Estos dos procesos se pueden atribuir a la generación del catión radical en el macrociclo tetrapirrólico como ya se explicó anteriormente.⁴⁵⁷ En la díada ZnTCP-C₆₀ tanto la porfirina como el fullereno, se pueden reducir de forma reversible dando lugar a la respuesta voltamétrica observada (Figura N°61A).³⁰² Por otro lado, cuando el potencial aplicado en el escaneo anódico se extiende hasta 1,4 V, se produce el tercer proceso oxidativo y se observa un incremento continuo en las corrientes de Faraday lo que se pone de manifiesto en cada uno de los ciclos voltamétricos aplicados de manera sucesiva (Figura N°61B). Estos incrementos, se deben a la formación de una película polimérica en la superficie del electrodo, generado por el acoplamiento de cationes radicales del carbazol. Estos resultados se observaron en estudios previos de porfirinas con sustituyentes carbazol en posiciones *meso*.^{381, 399} Una electropolimerización similar se realizó sobre electrodos semitransparentes de ITO obteniéndose películas del fotosensibilizador de gran área. Con

estas superficies se llevaron a cabo los estudios espectroscópicos, de fotooxidación de sustratos y de inactivación fotodinámica.

La superficie ZnCBATPA, se obtuvo de la misma manera que se describe en trabajos previos.^{381, 459} Por otro lado, se hizo crecer la porfirina base libre CBZTPA sobre una película polimérica de la porfirina metalada con Zn previamente electrodepositada como se explicó anteriormente en la sección 4.19.1. De esta manera, se obtiene una bicapa polimérica compuesta por: una capa del polímero ZnCBZTPA y otra de CBZTPA. La Figura N°62, muestra las respuestas de la VC del electropolímero ZnCBZTPA (línea roja) después de diez ciclos de electrodeposición, y la VC de la correspondiente bicapa ZnCBZTPA/CBZTPA después de diez ciclos de electropolimerización de CBZTPA sobre la película formada por la porfirina metalada (línea de color negro).

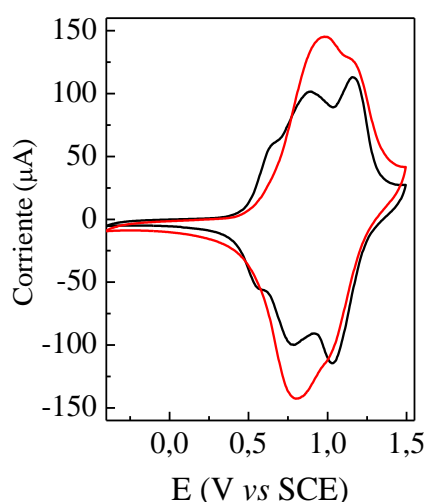
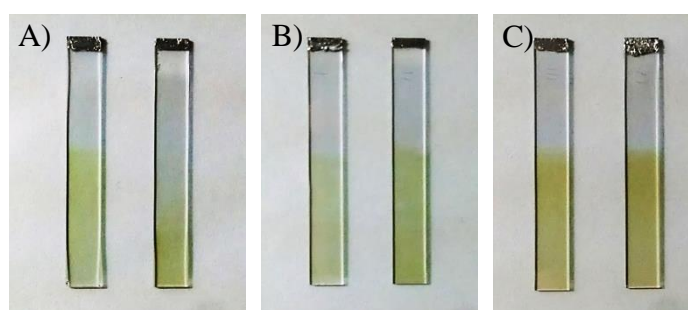


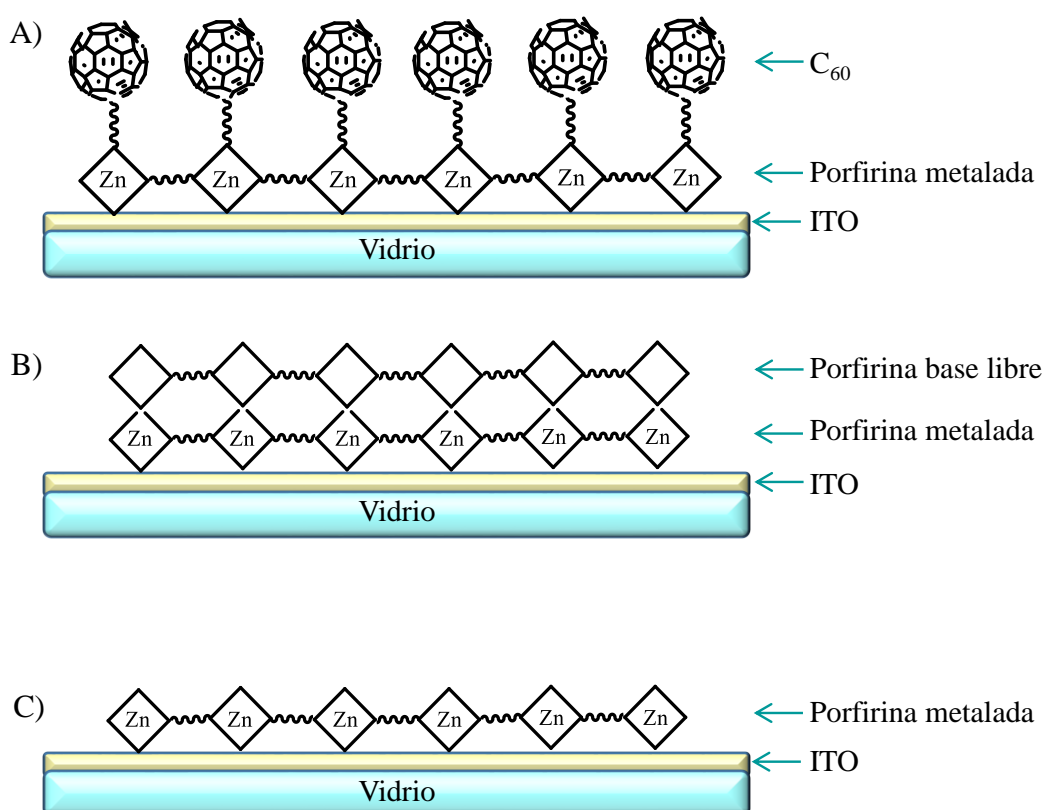
Figura N°62. VC obtenidos como respuesta de las bicapas electropolimerizadas de ZnCBZTPA/CBZTPA en DCE sólo con el electrolito soporte. La línea negra corresponde a la VC luego de la deposición de la primera capa, y la línea roja luego de la deposición de la segunda capa. Electrodo de trabajo de Pt. Todas las VC se obtuvieron con una velocidad de barrido de 100 mV/s.

La VC obtenida para la primera capa de ZnCBZTPA es similar a la reportada en trabajos previos⁴⁵⁹ mientras que en la bicapa es posible observar la contribución a las corrientes farádicas de oxidación-reducción de ambas capas. De la misma manera, en un trabajo previo se formaron bicapas de porfirinas base libre y metalada con Zn, las cuales estaban sustituidas en las posiciones *meso* del anillo tetrapirrólico por grupos carbazol.⁴⁵⁸ En estas superficies también se observó, que la formación de la segunda capa de ZnCBZTPA produce un aumento de las corrientes de oxidación-reducción respecto a la observada para la primera capa. Los mismos resultados se observaron cuando se construyeron las películas formadas por las porfirinas TCP y ZnTCP los cuales se describen en la sección 4.19.1.

En el Esquema N°80, se presentan las superficies obtenidas mediante VC y que van a ser empleadas para la inactivación fotodinámica de microorganismos. En el Esquema N°81 se observa una representación sencilla de los polímeros que se estudiaron en esta tesis doctoral. Así, se construyeron dos películas con capacidad de formar un estado de separación de carga fotoinducido, ZnTCP-C₆₀ y ZnCBZTPA/CBZTPA, por lo que pueden actuar mediante un mecanismo fotodinámico tipo I y tipo II. Por otro lado, se creó una superficie formada sólo por la porfirina coordinada con el metal Zn, esto es ZnCBZTPA, por lo que va a actuar mediante un mecanismo tipo II principalmente. En este caso, el agregado del metal Zn(II) favorece la formación de un estado excitado triplete y por lo tanto, la generación de O₂(¹Δ_g).



Esquema N°80. Fotografías de las superficies con polímeros electroquímicos de (A) ZnTCP-C₆₀, (B) ZnCBZTPA y (C) la bicapa de ZnCBZTPA/CBZTPA, sobre electrodos de ITO.

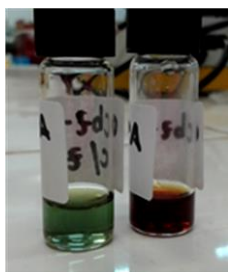


Esquema N°81. Dibujos representativos de las superficies poliméricas formadas por (A) la díada ZnTCP-C₆₀, (B) la bicapa ZnCBZTPA/CBZTPA y por (C) ZnCBZTPA.

4.26. Propiedades espectroscópicas

4.26.1. Propiedades espectroscópicas de los nuevos fotosensibilizadores

Los espectros de absorción UV-visible, para los distintos fotosensibilizadores que se emplearon para la fabricación de las superficies antibacterianas, se tomaron en dos solventes: tolueno y DMF (Figura N°63 y Figura N°64). La porfirina base libre CBZTPA presenta una banda *Soret* a 430 nm en tolueno y a 427 nm en DMF. Además, su espectro muestra cuatro bandas *Q* a 521, 560, 601 y 655 nm en ambos solventes. Estas son características de porfirinas base libre sustituidas en posición *meso*.⁴⁰² Por otro lado, el espectro de absorción UV-visible para la porfirina coordinada con zinc (ZnCBZTPA) muestra una banda *Soret* a 438 nm en tolueno y a 437 nm en DMF. También, presenta dos bandas *Q*, llamadas α y β , a 563 y 608 nm en ambos solventes (Figura N°63A y Figura N°64A). Cuando las porfirinas forman complejos con metales divalentes, tales como Zn(II), el número de bandas *Q* se reduce a dos y se denotan como α (banda de menor energía) y β (banda de mayor energía).^{8, 10} Resultados similares se encontraron en estudios previos^{185, 381} y se discutieron en detalle en la sección 4.20.1. La diferencia en el número de bandas en los espectros de absorción UV-visible de CBZTPA y ZnCBZTPA, se ve reflejado en diferentes coloraciones de las soluciones preparadas en ambos solventes (Esquema N°82).



Esquema N°82. Soluciones en tolueno de ZnCBZTPA (izquierda) y CBZTPA (derecha).

La díada TCP-C₆₀ tiene un espectro de absorción en la región visible del espectro muy similar al de la porfirina sustituida por cuatro grupos carbazol en posición *meso* llamada TCP. Sin embargo, por debajo de los 400 nm, la absorción de TCP-C₆₀ es mayor que la de TCP debido a la contribución del fullereno C₆₀, que presenta un máximo de absorción a ~330 nm.^{275, 277} Esto se observa en los espectros tomados tanto en tolueno como en DMF (Figura N°63B y Figura N°64B). Como se puede apreciar, el espectro de la díada es esencialmente una combinación lineal de los espectros de los monómeros correspondientes y estos son consistentes con una interacción débil en el estado fundamental, indicando que ambos cromóforos retienen sus identidades individuales. En el caso de la díada coordinada con Zn, se observa una banda *Soret* a ~434 nm, dos bandas *Q* en 562 y 607 nm y la banda del

fullereno C₆₀ a ~330 nm independientemente del solvente. Una vez más, la presencia de dos bandas *Q* confirma que ésta molécula se encuentra coordinada con el metal Zn(II). El mismo resultado se encontró en un trabajo previo con una díada metalada con zinc.³⁰¹

Wang y col., llevaron a cabo estudios teóricos de las propiedades espectroscópicas de un macrociclo tetrapirrólico coordinado con el metal Zn(II). Para los cálculos emplearon la teoría del funcional de la densidad (DFT) en estado estacionario y resuelto en el tiempo (TD-DFT). El espectro de absorción de esta molécula la explicaron a partir del modelo de *Gouterman's Four-Orbital*.⁴⁷³ Todos los estudios confirman que la reducción en el número de bandas de las porfirinas coordinadas con metales se pueden explicar eficientemente considerando las transiciones π - π^* de estas moléculas.

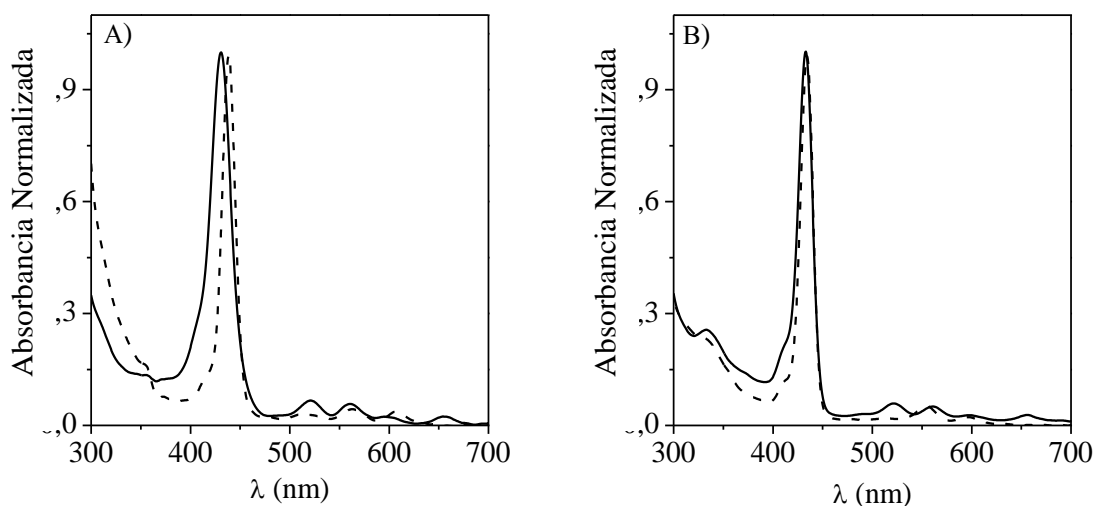


Figura N°63. Espectros de absorción UV-visible de: (A) CBZTPA (línea sólida) y ZnCBZTPA (línea de rayas); (B) TCP-C₆₀ (línea sólida) y ZnTCP-C₆₀ (línea de rayas) en tolueno.

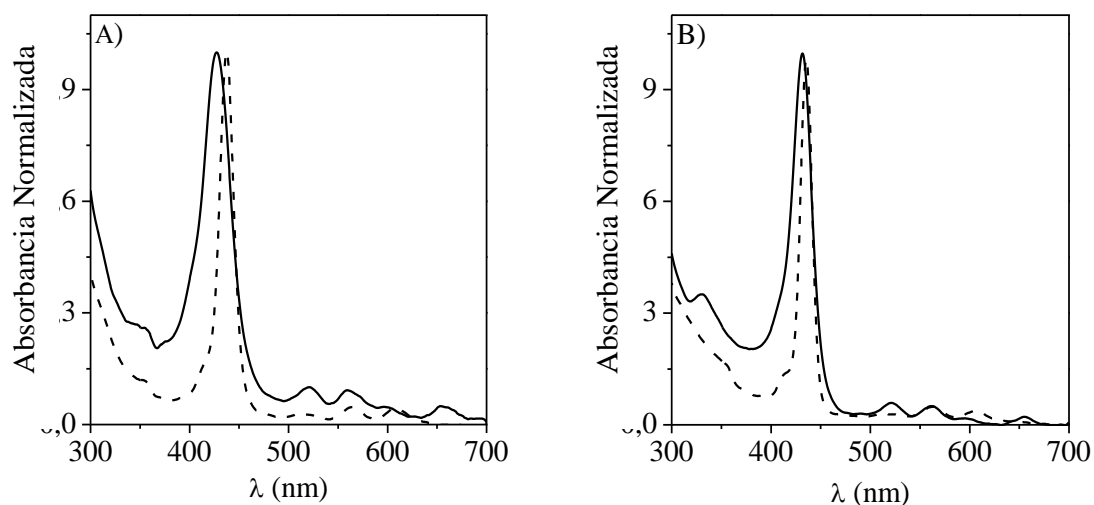


Figura N°64. Espectros de absorción UV-visible de: (A) CBZTPA (línea sólida) y ZnCBZTPA (línea de rayas); (B) TCP-C₆₀ (línea sólida) y ZnTCP-C₆₀ (línea de rayas) en DMF.

Los espectros de emisión de fluorescencia de las porfirinas y de las díadas empleadas para la construcción de superficies, se compararon con los compuestos modelo (TCP y TCP-C₆₀) en tolueno y en DMF, excitando las muestras a 550 nm (Figura N°65).

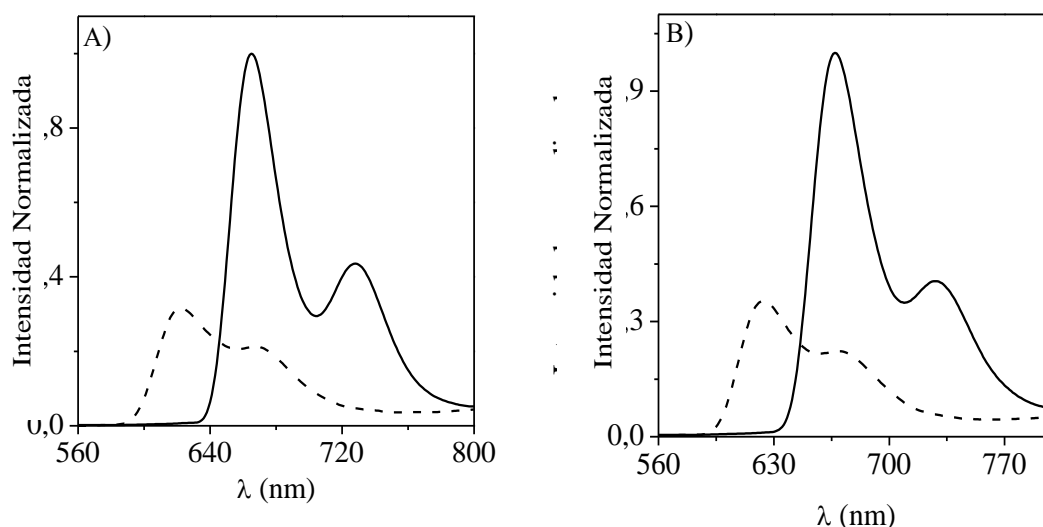


Figura N°65. Espectros de emisión de fluorescencia de CBZTPA (línea continua) y ZnCBZTPA (línea de rayas) en (A) tolueno y (B) DMF; $\lambda_{exc}=550$ nm.

Las dos bandas alrededor de 665 y 730 nm observadas para CBZTPA, son características de porfirinas sustituidas en posición *meso*.³⁹⁹ Estas bandas han sido asignadas a las transiciones $Q_x(0-0)$ y $Q_x(0-1)$.⁴⁰¹ Este comportamiento es típico de porfirinas base libre con simetría D_{2h} e indica que la estructura vibrónica de la misma se mantiene prácticamente sin cambios tras la excitación.⁴⁰⁰ A partir de las longitudes de onda de la última banda de absorción y la primera banda de emisión (banda $Q_x(0-0)$), se determinó un desplazamiento de Stokes de ~10 nm para CBZTPA (Tabla N°9). Pequeños cambios indican que en estas moléculas la energía de absorción es similar a la energía de relajación del estado singlete excitado de más baja energía (S_1), lo que está de acuerdo con la estructura plana y rígida del macrociclo tetrapirrólico. Eso sugiere que sólo una relajación geométrica menor se produce en el primer estado excitado. Este comportamiento se vio tanto en tolueno como en DMF. En la porfirina ZnCBZTPA coordinada con el metal, se observan dos bandas Q a 622 y 671 nm. Por lo general, las moléculas metaladas presentan pequeños corrimientos de Stokes (~5-7 nm) lo que indica que la energía de absorción al primer estado excitado singlete es muy similar a la energía de relajación de este mismo estado.⁴⁰⁸ La forma de las bandas y los valores de λ_{em} para las distintas porfirinas no cambian apreciablemente en DMF indicando que la forma monomérica es la principal especie responsable de la emisión de fluorescencia. Las propiedades de emisión de las porfirinas coordinadas con metales varían en función de cual sea el mismo. Por ejemplo, TPP y ZnTPP exhiben fluorescencia y fosforescencia a baja

temperatura, mientras que los complejos paramagnéticos de TPP no muestran prácticamente fluorescencia. MnTPP presenta sólo fosforescencia a baja temperatura, mientras que NiTPP no es luminiscente.⁴⁷⁴

Los Φ_F de estos fotosensibilizadores se calcularon en DMF y en tolueno empleando como referencia la porfirina TCP (Figura N°10). Los valores de Φ_F para CBZTPA y ZnCBZTPA están de acuerdo con aquellos reportados con anterioridad para derivados de porfirina similares.¹⁶² El Φ_F para la porfirina metalada con Zn es menor que para la base libre. Este resultado se debe a un efecto de átomo pesado producido por el metal que favorece la formación del estado excitado triplete del fotosensibilizador a través de un entrecruzamiento de sistemas.²⁴⁷ La misma tendencia se observó con la porfirina TMP que presenta un $\Phi_F=0,14$ y con ZnTMP ($\Phi_F=0,049$) ambas en tetrahidrofurano.²⁴³

Es importante tener en cuenta el objetivo de una molécula a la hora de planificar su diseño y llevar a cabo la posterior síntesis. En función del metal que se coordine con la porfirina van a ser las características de fluorescencia de las mismas. Así, estudios previos con derivados de porfirinas formando complejos con Cu(II) no mostraron bandas de emisión de fluorescencia.¹⁸⁵ Por otro lado, complejos con Pd(II) evidencian una intensidad de emisión muy baja ($\Phi_F \sim 10^{-4}$).⁴⁰⁸ En este caso, el agregado de Pd favorece el acoplamiento spin-órbita dando lugar a un entrecruzamiento de sistemas prácticamente total.⁴⁶¹ En cambio, los macrociclos tetrapirrólicos coordinados con Zn muestran un Φ_F considerable siendo este aproximadamente la mitad del de la misma molécula base libre.¹⁸⁵ Este comportamiento se debe a que el tiempo de vida del estado excitado singlete de una porfirina coordinada con Zn (ZnTPP, $\tau_s = 2,7$ ns; ZnP, $\tau_s = 2,6$ ns) es menor al de la porfirina base libre (TPP, $\tau_s = 10,1$ ns; P, $\tau_s = 11,4$ ns).^{185, 475}

Tabla N°9. Propiedades espectroscópicas de los fotosensibilizadores en distintos medios.

Fotosensibilizador	TCP	CBZTPA	ZnCBZTPA	TCP-C ₆₀	ZnTCP-C ₆₀
$\lambda_{\max}^{Soret}(\text{nm})^a$	434	430	438	433	434
$\lambda_{\max}^{Soret}(\text{nm})^b$	434	427	437	431	435
$\lambda_{\max}^{Em}(\text{nm})^a$	667	665	623	667	610
$\lambda_{\max}^{Em}(\text{nm})^b$	666	667	624	667	610
Φ_F^a	0,15±0,02	0,12±0,02	0,07±0,02	(5,1±0,4)×10 ⁻³	(2,1±0,3)×10 ⁻³
Φ_F^b	0,12±0,02	0,11±0,02	0,06±0,02	(4,2±0,3)×10 ⁻³	(1,1±0,4)×10 ⁻³

^a tolueno, ^b DMF

Los estudios de emisión de fluorescencia llevados a cabo con ZnTCP-C₆₀ presentan resultados diferentes a los obtenidos con porfirinas. La díada coordinada con Zn(II) muestra una emisión muy débil de la porfirina, lo que indica una desactivación del estado excitado singlete del anillo por parte del fullereno C₆₀ unido covalentemente (Figura N°66). La eficiencia del *quenching* en DMF se estimó en $\eta_q > 0,99$. Estos valores son análogos a los descritos anteriormente para los derivados de porfirina unidos covalentemente a la estructura del fullereno.^{301, 476} En este caso, la presencia del metal estaría favoreciendo la transferencia de energía o de carga, dependiendo del solvente, desde la porfirina al fullereno C₆₀.³⁰¹

Los espectros de fluorescencia también se tomaron excitando la díada ZnTCP-C₆₀ a 430 nm en tolueno y en DMF. A esta longitud de onda tanto la porfirina como el fullereno absorben luz. Cuando la muestra se excita a 430 nm, en ambos solventes aparece una banda a 720 nm correspondiente a la emisión del fullereno. La fluorescencia del C₆₀ se evidencia claramente en tolueno, mientras que en DMF se observa una emisión más débil (Figura N°66). Estos resultados sugieren que en tolueno hay una transferencia de energía desde el estado excitado singlete de la porfirina al fullereno. La energía del estado excitado singlete de ¹ZnP*-C₆₀ y ZnP-¹C₆₀*, se calcularon en tolueno teniendo en cuenta la energía de la transición electrónica 0-0, lo que dio como resultado 2,04 y 1,75 eV, respectivamente. Estos valores muestran que la transferencia de energía desde el estado excitado singlete de la porfirina al fullereno C₆₀ es un proceso exotérmico dado por 0,29 eV. En cambio, en un disolvente más polar como DMF, existe además una vía de transferencia de electrones lo que da lugar a un estado de separación de carga fotoinducido.^{301, 303}

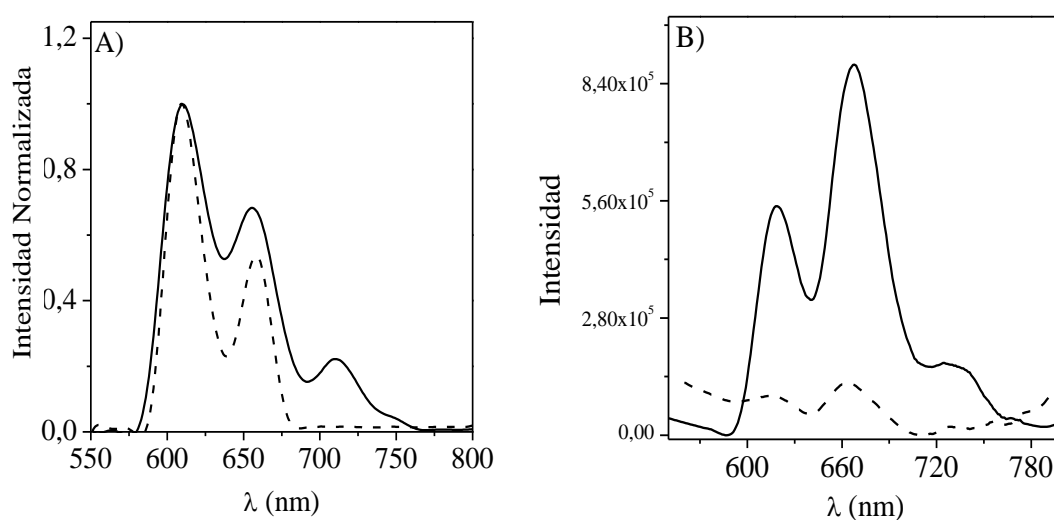


Figura N°66. Espectros de emisión de fluorescencia de ZnTCP-C₆₀ en (A) tolueno y (B) DMF. $\lambda_{exc}=430$ nm (línea continua); $\lambda_{exc}=550$ nm (línea de rayas).

4.26.2. Propiedades espectroscópicas de las nuevas películas poliméricas

Los espectros de absorción UV-visible de las películas poliméricas sobre electrodos de ITO se muestran en la Figura N°67. Todos los espectros se corrigieron teniendo en cuenta la absorción del electrodo transparente ITO. Estas películas mostraron una banda *Soret* a ~440 nm y dos bandas *Q* entre 535 a 670 nm las cuales son típicas de los derivados de porfirinas sustituidos en posición *meso*. Los resultados de la espectroscopia UV-visible confirman la electropolimerización de los derivados de porfirinas sobre el ITO y además, ponen de manifiesto que estos macrociclos tetrapirrólicos polimerizados, tienen similares transiciones electrónicas a las observadas en solución. Sin embargo, las bandas de las porfirinas electropolimerizadas, son más anchas que las correspondientes al fotosensibilizador en estado monomérico. El máximo de la banda de *Soret* de los derivados de porfirina, muestra un corrimiento batocrómico de ~10 nm con respecto a la misma en solución homogénea. Un comportamiento similar se observó previamente para las películas generadas por voltametría cíclica empleando derivados de porfirinas que contienen grupos *N,N*-difenilaminofenilos o carbazoles como sustituyentes en posiciones *meso*.^{381, 399} Estos hechos indican la existencia de una interacción entre las porfirinas que están formando la estructura de la película hiper-ramificada. Resultados semejantes se encontraron en superficies preparadas con otras porfirinas.^{337, 462}

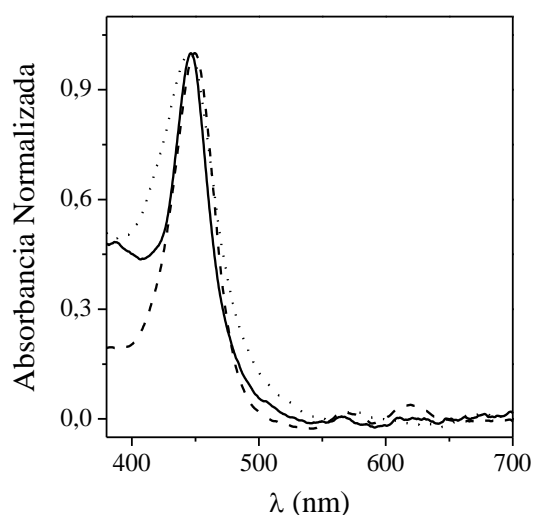


Figura N°67. Espectros de absorción UV-visible de los polímeros ZnTCP-C₆₀ (línea continua), ZnCBZTPA (línea de rayas) y ZnCBZTPA/CBZTPA (línea de puntos) corregidos por la absorción del electrodo transparente de óxido de indio y estaño (ITO).

Los espectros de emisión de fluorescencia para la superficie formada por ZnTCP-C₆₀ no mostraron las bandas características del macrociclo tetrapirrólico. Esto se debió a que la díada como monómero, posee una emisión de fluorescencia muy baja en solución debido a

la desactivación del estado excitado de la porfirina por el fullereno C₆₀ (Tabla N°9). Tampoco se observó la emisión de las superficies formadas por porfirinas. Esto puede deberse a una agregación de la molécula como consecuencia del crecimiento del polímero, lo que desactiva el estado excitado del mismo mediante decaimientos no radiativos. Por otro lado, en el proceso electroquímico de producción de estas superficies suelen quedar atrapadas sales que posiblemente produzcan una desactivación del estado excitado del fotosensibilizador no pudiéndose observar la emisión característica de los fotosensibilizadores.

4.27. Fotólisis en estado estacionario

4.27.1. Fotooxidación de DMA

Para detectar la capacidad de producir O₂(¹Δ_g) en solución por parte de los fotosensibilizadores empleados para construir las superficies antimicrobianas, se utilizó el sustrato DMA. El comportamiento de este sustrato ya se describió en la sección 4.4. En este caso, la fotooxidación del DMA inducida por porfirinas y díadas se estudió en tolueno y en DMF en condiciones aeróbicas. Las muestras se irradiaron a 434±5 nm, longitud de onda a la cual la especie que absorbe es principalmente el macrociclo tetrapirrólico. Por lo tanto, los procesos fotofísicos en ambas díadas se iniciaron a partir de la excitación de la unidad de porfirina. La fotodegradación del DMA se siguió a partir de los espectros de absorción. En todos los casos estudiados, la fotooxidación sigue una cinética de *pseudo* primer orden a una longitud de onda de 379 nm con respecto a la concentración de DMA. A partir de los gráficos característicos (Figura N°68), que describen el progreso de la reacción del DMA, se calcularon los valores de k_{obs} para cada fotosensibilizador (Tabla N°10). Estos resultados se utilizaron para obtener los valores de Φ_{Δ} .⁴¹⁸ A partir de los datos presentados en la Tabla N°10, es posible observar que las porfirinas CBZTPA y ZnCBZTPA producen cantidades considerables de O₂(¹Δ_g) tanto en tolueno como en DMF. Así, el Φ_{Δ} calculado con la Ecuación N°6 (sección materiales y métodos), es independiente de la polaridad del solvente. Por otro lado, se muestra un valor mayor de k_{obs} y por lo tanto de Φ_{Δ} , para la porfirina coordinada con Zn(II). Esto se debe a que el metal aumenta el rendimiento de formación del estado excitado triplete (Φ_T) de la porfirina y por lo tanto favorece la producción de O₂(¹Δ_g).²⁴⁷

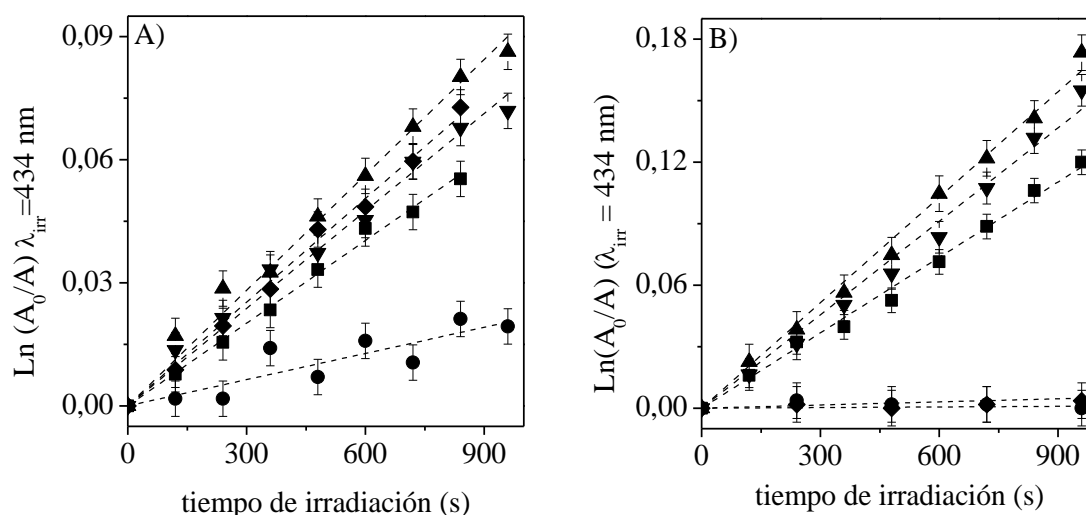


Figura N°68. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de DMA (35 μM) fotosensibilizada por las porfirinas ZnCBZTPA (▲), TCP-C₆₀ (◆), CBZTPA (▼), TCP (■) y ZnTCP-C₆₀ (●) en (A) tolueno y (B) DMF ($A^{\text{Soret}} = 0,1$, $\lambda_{irr} = 430\text{ nm}$).

Las porfirinas base libre y coordinadas con metales presentan valores de Φ_{Δ} que varían entre 0,21-0,67. Aquellas con el metal Cu poseen valores de Φ_{Δ} más bajos. Esto se debe a que dicho metal es paramagnético y desactiva el estado excitado del fotosensibilizador y por lo tanto disminuye el tiempo de vida del estado excitado triplete.⁴⁶⁰ Por otro lado, las porfirinas coordinadas con zinc muestran los valores más altos de Φ_{Δ} , esto se debe a que el entrecruzamiento de sistemas, desde el estado excitado singlete al triplete, se ve favorecido y el tiempo de vida del estado triplete aumenta. Este efecto se atribuye a que el Zn(II) es diamagnético.⁴⁶⁰ Milanesio y col., demostraron que cuando la porfirina se coordina con Cd los valores de las constantes de velocidad observadas aumentan aproximadamente al doble ($k_{obs}(\text{P}) = (3,62 \pm 0,04) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ y $k_{obs}(\text{CdP}) = (7,68 \pm 0,05) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) y por lo tanto los rendimientos de producción de oxígeno singlete también ($\Phi_{\Delta}(\text{P}) = 0,24$ y $\Phi_{\Delta}(\text{CdP}) = 0,51$). Así, la porfirina CdP en concentración de 1 μM , resultó más efectiva para inactivar la línea celular Hep-2 de laringe de carcinoma humano luego de 24 horas de incubación con el fotosensibilizador y con una dosis de luz de 50 J cm^{-2} .²⁴³ Por otro lado, los mismos autores determinaron los Φ_{Δ} con distintos derivados de porfirinas con grupos metoxifenilo en posiciones *meso*. Encontraron que la porfirina base libre y aquellas que forman un complejo metálico con Zn(II) y Cd(II) producen $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ de manera considerable mientras que el macrociclo tetrapirrólico coordinado con Cu(II) prácticamente no genera $\text{O}_2(^1\Delta_g)$.⁴⁰⁸ Dąbrowski y col. encontraron que ZnTPPS y PdTPPS presentan el mayor Φ_{Δ} en comparación con la base libre TPPS.⁴⁷⁴ También hallaron que la presencia del metal Zn(II) disminuye marcadamente la hidrofobicidad y da lugar a ciertas propiedades fotofísicas que vuelven a

estos fotosensibilizadores eficientes para la PDI.⁴⁷⁴ Mroz y col., encontraron que las porfirinas coordinadas con Pd generan mayor cantidad de radical hidroxilo que las que poseen el metal zinc debido a que es un mejor aceptor de electrones.⁴⁷⁷ La reducción del paladio es mejor que la del zinc cuando están coordinados con porfirinas y como consecuencia, PdP es un mejor oxidante que ZnP.⁴⁷⁷ Por otro lado, estudios con macrociclos coordinados con distintos metales se ensayaron para la PDI de *S. aureus* y *E. coli*.⁴⁶¹ Los autores encontraron que con los metales Fe(II) y Cu(II) las porfirinas no generan $O_2(^1\Delta_g)$ pero que en presencia de Pd o Zn si lo hacen y en cantidades considerables. Además, observaron que este resultado se correlaciona directamente con la capacidad del fotosensibilizador para inactivar los microbios.⁴⁶¹

Tabla N°10. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de DMA (k_{obs}^{DMA}) en DMF y tolueno.

Fotosensibilizador	$k_{obs}^{tolueno} (s^{-1})$	$\Phi_{\Delta}^{tolueno}$	$k_{obs}^{DMF} (s^{-1})$	Φ_{Δ}^{DMF}
TCP	$(0,67 \pm 0,03) \times 10^{-4}$	$0,42 \pm 0,02$	$(1,23 \pm 0,02) \times 10^{-4}$	$0,41 \pm 0,02$
CBZTPA	$(0,79 \pm 0,02) \times 10^{-4}$	$0,50 \pm 0,02$	$(1,52 \pm 0,03) \times 10^{-4}$	$0,51 \pm 0,02$
ZnCBZTPA	$(0,93 \pm 0,02) \times 10^{-4}$	$0,58 \pm 0,03$	$(1,72 \pm 0,03) \times 10^{-4}$	$0,57 \pm 0,02$
TCP-C ₆₀	$(0,84 \pm 0,01) \times 10^{-4}$	$0,53 \pm 0,02$	$(5,1 \pm 0,9) \times 10^{-6}$	$0,010 \pm 0,002$
ZnTCP-C ₆₀	$(0,22 \pm 0,02) \times 10^{-4}$	$0,14 \pm 0,02$	$(9,8 \pm 0,1) \times 10^{-7}$	$0,002 \pm 0,001$

Las díadas TCP-C₆₀ y ZnTCP-C₆₀, producen $O_2(^1\Delta_g)$ en función de la polaridad del medio en el que se encuentran. Así, ambos fotosensibilizadores descomponen al sustrato DMA de manera eficiente en tolueno, mientras que en DMF la fotooxidación es considerablemente más lenta. A pesar que estas moléculas en DMF se encuentran fundamentalmente como monómeros, las velocidades de fotooxidación de DMA disminuyen considerablemente en comparación con la porfirina TCP. Por lo tanto, un proceso competitivo debe participar en este solvente más polar, tal como la formación de un estado de separación de carga fotoinducido desde la porfirina al fullereno C₆₀. En el caso de la díada TCP-C₆₀, el valor de $O_2(^1\Delta_g)$ se puede comparar en ambos solventes y fue 56 veces más bajo en DMF que en tolueno. Además, el Φ_{Δ} para TCP-C₆₀ fue 41 veces menor que la encontrada para TCP en DMF (Tabla N°10). Así, la generación de $O_2(^1\Delta_g)$ para esta molécula es fuertemente dependiente de la polaridad del microambiente en donde se localiza. Se determinó el cambio de energía libre para la transferencia de carga desde $^1TCP^*$ al fullereno

C₆₀ y se obtuvo un valor de $\Delta G = -0,62$ eV. Este resultado estaría indicando que el proceso de transferencia de carga entre los monómeros es favorable.

Por otro lado, para la díada ZnTCP-C₆₀ disuelta en tolueno, se obtuvo un valor de k_{obs} menor que para TCP-C₆₀ y que para TCP. Esto se debe a que en este fotosensibilizador, la transferencia de carga desde la porfirina al fullereno C₆₀ se ve favorecida por la presencia del metal Zn(II). Estos resultados están de acuerdo con un trabajo previo en el que se sintetizó una díada porfirina-fullereno C₆₀ sustituida en posiciones *meso* por grupos metoxi y coordinada con Zn(II).³⁰¹ Mediante estudios de fotólisis en estado estacionario en presencia de un aceptor y dador de electrones, metil viológeno (MV²⁺) y *N,N,N',N'*-tetrametil-1,1'-naftidina (TMN), se demostró que el estado de separación de carga fotoinducido (ZnP^{•+}-C₆₀^{•-}) se ve favorecido por la presencia del metal Zn(II).

4.27.2. Fotooxidación de ABMM

Para detectar la capacidad de las superficies para producir O₂(¹Δ_g) en agua, se utilizó el derivado del antraceno (ABMM), el mismo empleado para el estudio de fotooxidación llevado a cabo con las primeras superficies construidas (sección 4.21.1).¹⁹³ Para estos estudios también se empleó la molécula de referencias TPPS⁴⁻. En la Tabla N°11 se observan los valores de k_{obs} obtenidos a partir del gráfico que se muestra en la Figura N°69. Se observó nuevamente que el electrodo transparente de ITO sin las películas de porfirina, no produce la descomposición del sustrato ABMM, por lo que no genera cantidades considerables de O₂(¹Δ_g) en las condiciones del experimento.

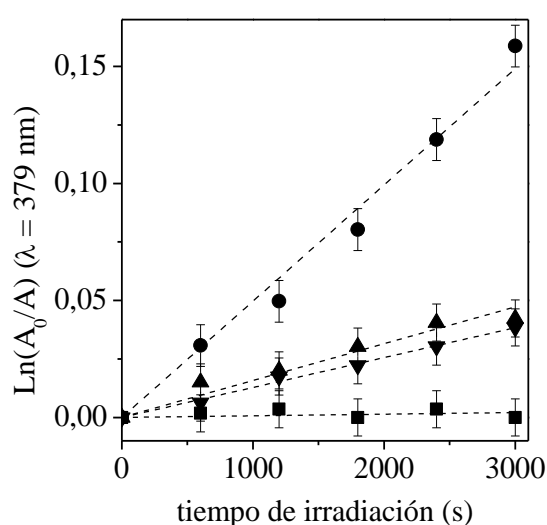


Figura N°69. Gráficos de primer orden para la fotooxidación de ABMM (35 μM) fotosensibilizada por las superficies: ZnTCP-C₆₀ (●), ZnCBZTPA (▲) y ZnCBZTPA/CBZTPA (▼) depositados sobre ITO, electrodo de ITO (■) y en agua ($A^{Soret} = 0,1$, $\lambda_{irr} = 455-800$ nm).

Como se puede observar, para la descomposición de ABMM fotosensibilizada por la película ZnTCP-C₆₀ se obtuvo un valor alto de velocidad de reacción. Sin embargo, la k_{obs}^{ABMM} más elevada se encontró para la reacción fotosensibilizada por TPPS⁴⁻ en solución. Se sabe que la TPPS⁴⁻ presenta un efecto fotodinámico eficiente en agua, con un rendimiento de producción de O₂(¹Δ_g) de 0,74.²⁵² La fotodescomposición del derivado del antraceno mediada por la película de ZnTCP-C₆₀ es cinco veces menor que la obtenida para la porfirina aniónica en agua. Por el contrario, se observan valores muy bajos de k_{obs}^{ABMM} utilizando la monocapa de porfirina metalada y la bicapa ZnCBZTPA/CBZTPA. Posiblemente, estos resultados se deban a la disposición de los fotosensibilizadores en la superficie del ITO, que deja al fullereno C₆₀ más libre para la producción de O₂(¹Δ_g). Esto se debe a que ambos fotosensibilizadores en la lámina pueden ser excitados dado que la irradiación se lleva a cabo entre 455-800 nm.

Tabla N°11. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de ABMM (k_{obs}^{ABMM}) en agua.

Fotosensibilizador	k_{obs}^{ABMM} (s ⁻¹)	$k_{obs}^{poli}/k_{obs}^{TPPS^{4-}}$ a
ZnTCP-C ₆₀ poli	(5,16±0,09)x10 ⁻⁵	0,16
ZnCBZTPA poli	(1,57±0,08)x10 ⁻⁵	0,05
ZnCBZTPA/CBZTPA poli	(1,28±0,03)x10 ⁻⁵	0,04
TPPS ⁴⁻	(3,31±0,09)x10 ⁻⁴	1,00

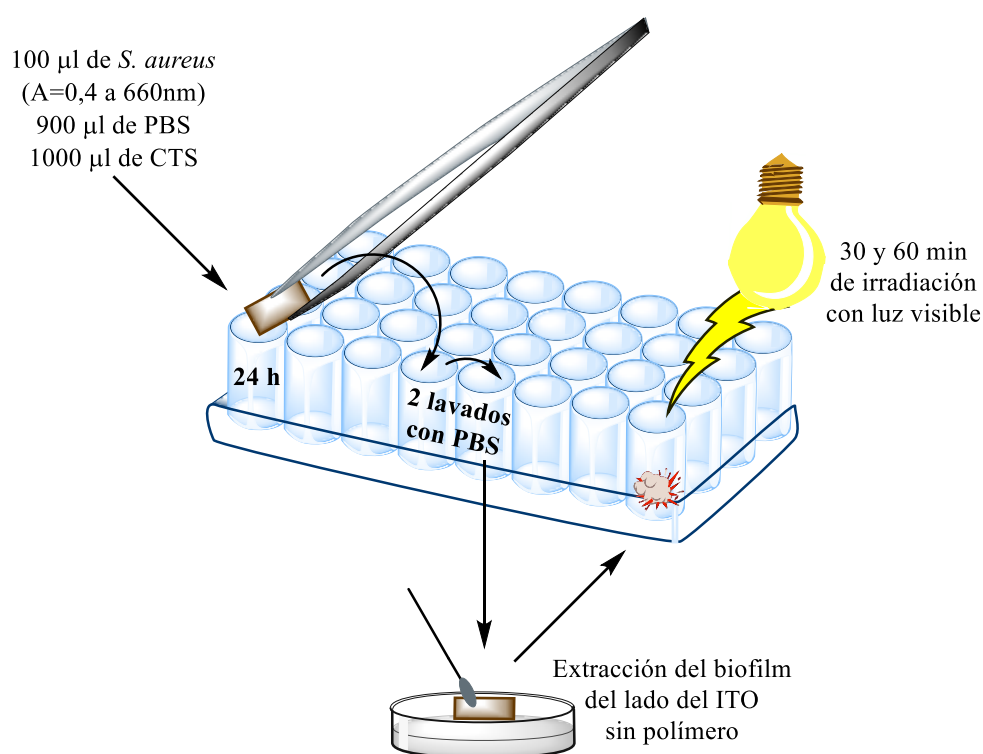
^a Relación para la fotooxidación de ABMM, A^{Soret} = 0,1; λ_{irr} = 455-800 nm.

4.28. Inactivación de biopelículas de *S. aureus* creciendo sobre superficies

4.28.1. Ensayos de PDI de biopelículas de *S. aureus*

La acción fotodinámica inducida por las películas poliméricas se estudió *in vitro* para inactivar biopelículas de *S. aureus*. La PDI de este microorganismo se investigó haciendo crecer sobre las superficies poliméricas generadas electroquímicamente, una biopelícula bacteriana. Esta metodología se siguió dado que *S. aureus* crece mayormente en forma de películas sobre las superficies.¹⁴⁷ De esta manera, se realiza un ensayo más cercano a la realidad y permite determinar si estas superficies pueden ser empleadas para inactivar células bacterianas que contaminan una superficie en un ambiente hospitalario.¹⁵² Cabe destacar, que el microbio al formar una biopelícula, posee una mayor resistencia y por lo tanto es más difícil de erradicar.¹⁵³ El procedimiento experimental llevado a cabo se resume en el Esquema N°83 y se detalla en la sección materiales y métodos. Las superficies con la biopelícula de *S. aureus*, antes de ser irradiadas se limpian con un hisopo. Esto es necesario

porque la biopelícula crece en todas las caras de la superficie y el polímero electroquímico activo se encuentra en un solo lado de la misma. La Figura N°70 muestra la supervivencia de las células bacterianas cuando son tratadas con superficies poliméricas con absorbancias de $\sim 0,1$ después de diferentes tiempos de irradiación. Los experimentos control indican que la viabilidad de *S. aureus* no se ve afectada cuando se mantienen las superficies con el fotosensibilizador en la oscuridad durante 60 min. Sin embargo, se produce una disminución en el número de células vivas de la biopelícula de $\sim 0,5$ log cuando el ITO, sin la película polimérica, se irradia durante 60 min. El ITO está formado por óxido de titanio, el cual es un semiconductor con un *band gap* de $\sim 3,3$ eV, razón por la cual su principal aplicación es en optoelectrónica y fotocatalisis.⁴⁷⁸ Debido a esta propiedad es que el TiO_2 , puede generar ROS mediante un mecanismo fotodinámico tipo I, produciendo una disminución en la viabilidad celular de la biopelícula de *S. aureus*.



Esquema N°83. Procedimiento para la inactivación fotodinámica de biopelículas de *S. aureus* creciendo sobre superficies electropolimerizadas.

En la Figura N°70, se observó una diferencia significativa en la muerte celular producida por la superficie con la monocapa de porfirina (ZnCBZTPA) comparada con la formada por la bicapa (ZnCBZTPA/CBZTPA) a los 30 min de iluminación. En este caso, resultó ser más efectiva la bicapa produciendo una mayor disminución en la viabilidad celular ($\sim 0,5$ log). Esto puede deberse a la capacidad de ZnCBZTPA/CBZTPA de formar un estado de separación de carga fotoinducido lo que le permite actuar mediante un mecanismo

de acción fotodinámica tipo I y tipo II. Por otro lado, a los 60 min de irradiación una de las superficies más eficiente para la PDI resultó ser la formada por la díada ZnTCP-C₆₀. Este resultado corresponde a una disminución en la supervivencia celular de ~97,7% (~1,6 log). Por lo tanto, cuando las películas poliméricas formadas por ZnTCP-C₆₀ son irradiadas con luz visible, resultan efectivas para inactivar biopelículas de *S. aureus*. Cabe destacar, que la superficie formada por la díada TCP-C₆₀, que ya había sido creada con la primera serie de superficies (sección 4.19.1), fue la que dio lugar a la mayor PDI de la biopelícula (~2 log). Esto puede deberse a que al no estar el macrociclo tetrapirrólico de la díada coordinado con el metal Zn, el polímero electroquímico genera mayor O₂(¹Δ_g) la cual es una de las ROS más efectiva para la PDI de microorganismos.

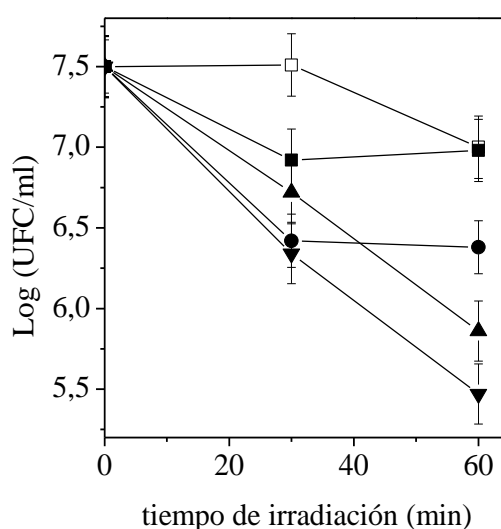


Figura N°70. Supervivencia de biopelículas de *S. aureus* (~10⁸ UFC/ml) creciendo sobre los polímeros de ZnCBZTPA ($A^{Soret} = 0,1$) (■), ZnCBZTPA/CBZTPA ($A^{Soret} = 0,1$) (●), ZnTCP-C₆₀ ($A^{Soret} = 0,1$) (▲), TCP-C₆₀ ($A^{Soret} = 0,1$) (▼) y el electrodo de ITO sin polímero antibacteriano (□).

En la presente investigación, las superficies se iluminaron con luz visible con el objetivo de inactivar biopelículas de *S. aureus*. En estas condiciones, ambos cromóforos de ZnTCP-C₆₀ se pueden excitar y producir ROS. Como se mencionó con anterioridad, la díada polimerizada puede generar un estado de separación de carga fotoinducido lo que contribuye a la producción de ROS para la inactivación de los microorganismos. En las películas que contienen la díada ZnTCP-C₆₀, la estructura del fullereno C₆₀ no está directamente involucrada en la formación del polímero, por lo que dicha molécula se encuentra más libre y alejada de la superficie del ITO. Se sabe que los derivados del fullereno C₆₀ son fotosensibilizadores eficaces para inactivar microorganismos.^{85, 161, 197} Además, estas estructuras son más fotoestables que los macrociclos tetrapirrólicos.⁵¹

Dado que a bajas absorbancias de superficie se logró reducir la viabilidad celular de las biopelículas de *S. aureus* en $\sim 1,6$ log luego de 60 min de irradiación, se realizaron estudios con mayor absorbancia del polímero electroquímico para lograr una elevada inactivación. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura N°71. Este estudio sólo se pudo llevar a cabo con las superficies formadas por porfirinas CBZTPA y ZnCBZTPA dado que cuando se electropolimerizan las díadas porfirina-fullereno C_{60} , no se puede lograr absorbancias de superficie mayores a $\sim 0,15$. Posiblemente se deba al tamaño de la esfera del fullereno C_{60} , lo que impermeabiliza la superficie para electropolimerizaciones siguientes.

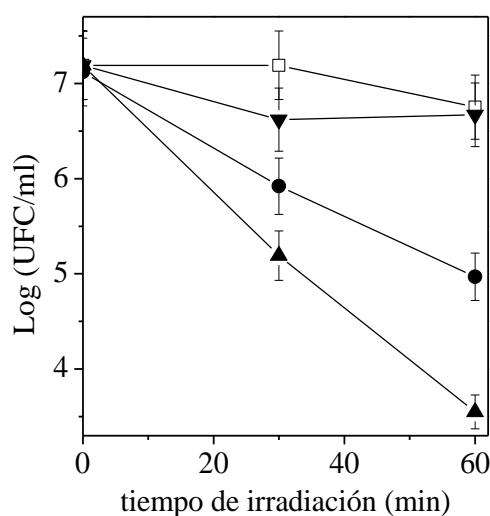


Figura N°71. Supervivencia de biopelículas de *S. aureus* ($\sim 10^8$ UFC/ml) creciendo sobre los polímeros de ZnCBZTPA ($A^{Soret} = 0,1$) (▼), ZnCBZTPA ($A^{Soret} = 0,4$) (●), ZnCBZTPA ($A^{Soret} = 0,7$) (▲) y el electrodo de ITO sin polímero antibacteriano (□).

La Figura N°71 muestra que al aumentar la absorbancia del polímero activo en la superficie del ITO la inactivación fotodinámica crece. Así, cuando se aumentó la absorbancia de $\sim 0,4$ a $\sim 0,7$ en la superficie ZnCBZTPA y se irradió al biopelícula por 60 min, se produjo una disminución en la viabilidad celular 2,2 log y 3,6 log, respectivamente. Es decir, que ZnCBZTPA con absorbancias de $\sim 0,4$ produce una inactivación del 99,4%, mientras que con absorbancias de $\sim 0,7$ inactiva el 99,97% de los microorganismos. Por otro lado, la superficie formada por la bicapa produjo una inactivación de 99,8% ($\sim 2,7$ log) con $A^{Soret} = 0,5$. Así, esta bicapa resulta más efectiva que la monocapa de porfirina base libre siendo más marcada la diferencia a los 30 min de irradiación. Este efecto posiblemente se deba a la capacidad de formar un estado de separación de carga fotoinducido entre las monocapas de porfirinas (una formada por macrociclos coordinados con el metal Zn y otra con porfirinas de base libre), lo que daría lugar al mecanismo de acción fotodinámica tipo I además del II.

4.28.2. Imágenes al microscopio de la PDI de biopelículas de *S. aureus*

El efecto citotóxico del fotosensibilizador polimerizado se analizó por diferentes técnicas microscópicas. La Figura N°72 muestra imágenes al microscopio confocal de biopelículas de *S. aureus* creciendo en la superficie con el polímero ZnCBZTPA con una absorbancia de $\sim 0,8$. En el control (Figura N°72A), la biopelícula cubre completamente la superficie. Luego de 60 min de irradiación, la película del microorganismo se observa desorganizada con un menor número de células como producto del tratamiento fotodinámico (Figura N°72B). Se observa que la biopelícula de *S. aureus* en algunos sectores se ha desprendido de la superficie y aunque todavía hay algunas células unidas, esta técnica no permite distinguir las células vivas de las muertas.

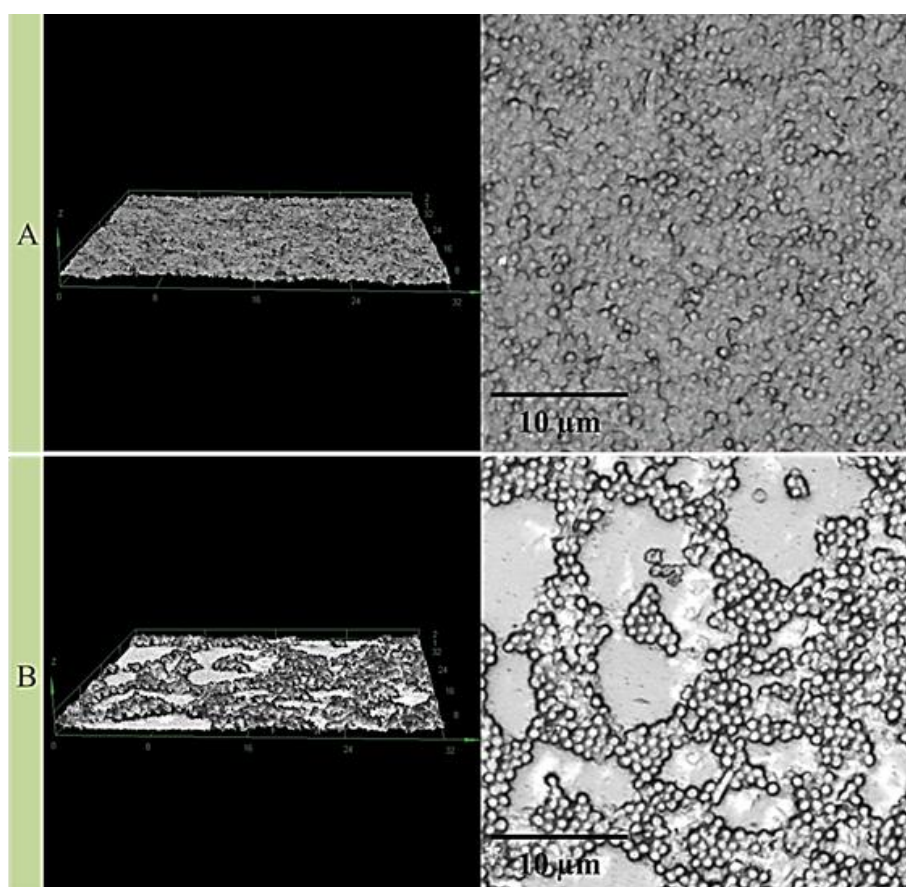


Figura N°72. Microscopia confocal de biopelículas de *S. aureus* creciendo en la superficie ZnCBZTPA ($A^{Soret} \sim 0,8$) (A) antes de ser irradiada y (B) luego de 60 min de irradiación con luz visible.

Estudios de PDI de biopelículas de *S. aureus* se llevaron a cabo con el fotosensibilizador 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N*-dimetilamonio)propoxi]fenil]porfirina en concentración de $20 \mu\text{M}$ y con una intensidad de irradiación de 180 J cm^{-2} .³⁹² Los autores obtuvieron imágenes de microscopia de barrido muy similares a las que se presentan en la

Figura N°72 con microscopia confocal. Se observó un desprendimiento de partes de la biopelícula, por lo que la PDI dio lugar a una alteración de su arquitectura.³⁹²

Para conocer más detalladamente la estructura de la biopelícula formada sobre el polímero generado electroquímicamente, se estudiaron las muestras mediante SEM. En la Figura N°73A se observa la superficie polimérica sin células. En la Figura N°73B se observa que la biopelícula de *S. aureus* ocupa la mayor parte de la superficie y no lo hace en forma de monocapa, sino que consiste en múltiples capas de células. Luego de que el polímero ZnCBZTPA con el microorganismo, se irradió con luz visible durante 60 min, se observó un revestimiento celular parcial con células aisladas y con una pérdida de estratificación (Figura N°73C). Debajo de las células enteras y entre ellas, se observan restos de un material diferente, que no están presentes en las Figura N°73A y B.

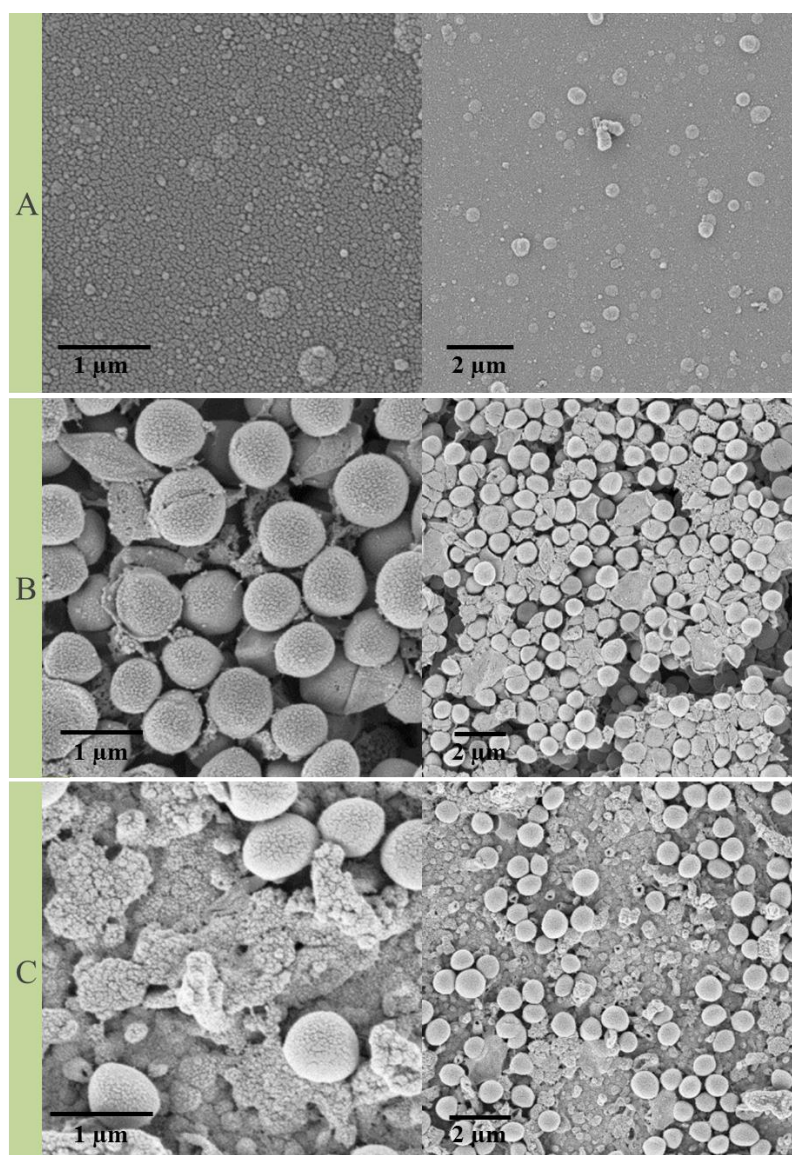


Figura N°73. (A) Imágenes SEM del polímero de ZnCBZTPA ($A^{Soret} \sim 0,8$). (B) Biopelícula de *S. aureus* creciendo sobre el polímero ZnCBZTPA en la oscuridad. (C) Biopelícula de *S. aureus* sobre el polímero de ZnCBZTPA luego de ser expuesto a la luz visible durante 60 min.

Sharma y col. investigaron el efecto que produce la PDI en la viabilidad y en la estructura de biopelículas de *S. aureus* meticilina resistente, empleando el fotosensibilizador azul de toluidina.⁴⁷⁹ Los autores observaron una inactivación significativa de este microbio por parte del fotosensibilizador cuando el mismo es irradiado con luz visible. Las imágenes tomadas con el microscopio confocal sugieren que el daño de las células se produce a nivel de membrana y por otro lado, las imágenes SEM dan una evidencia clara de la destrucción de la estructura de la biopelícula y de la disminución en el número de células del microorganismo.⁴⁷⁹ Cabe destacar, que hasta el momento todos los estudios desarrollados con fotosensibilizadores para la PDI de biopelículas, han sido llevados a cabo en solución. Este es uno de los primeros ensayos en los que se emplean superficies para inactivar *S. aureus* creciendo como biopelícula.

Pereira y col. estudiaron la disminución en la viabilidad celular de biopelículas de *S. aureus*, cuando son sometidos a la PDI empleando azul de metileno como fotosensibilizador.⁴⁸⁰ La reducción en la viabilidad celular fue mayor a ~3 log. Las imágenes SEM sugieren que la mayor muerte celular se produce predominantemente en las capas exteriores de la biopelícula.⁴⁸⁰ Este mismo resultado se observa en la Figura N°73 empleando los polímeros electroquímicos para la inactivación de biopelículas de *S. aureus*.

En el año 2016, Almatroudi y col. probaron la eficacia de la solución de hipoclorito de sodio frente a biopelículas de *S. aureus* creciendo sobre superficies secas.⁴⁸¹ Luego del tratamiento con lavandina, la biomasa de la biopelícula disminuyó 100 veces y hubo una reducción en la viabilidad celular de 7 log. Sin embargo, se determinó mediante tinción que aún quedaban células vivas del microbio. Por ello, tiempo después la biopelícula se volvió a formar.⁴⁸¹ Este trabajo pone de manifiesto que las biopelículas de *S. aureus* son difíciles de erradicar y que es necesaria la búsqueda de nuevas metodologías para evitar su formación en ambientes hospitalarios principalmente.

Las superficies descriptas en esta tesis doctoral se crean con la idea de generar ambientes estériles permanentes.³⁷¹ Este objetivo está inspirado en una problemática actual en hospitales de todo el mundo: las infecciones intrahospitalarias.³⁹ En estos lugares, el principal microorganismo que afecta la salud de pacientes internados es *S. aureus*. Este microbio, tiene la capacidad de adquirir resistencia a diferentes antibióticos de manera muy sencilla, lo que lo vuelve difícil de erradicar.¹³⁴ Además, cuando crece sobre diferentes superficies inanimadas, lo hace en forma de biopelícula. Esto es, comunidades bacterianas adheridas irreversiblemente a una superficie viva o inerte englobadas en una matriz de polisacáridos producida por ellas.¹⁴⁷ Las biopelículas están implicadas en infecciones

crónicas, lentas y resistentes a los tratamientos. En la clínica, ellos se forman en las superficies de tejidos naturales e implantes artificiales como válvulas cardíacas, prótesis, catéteres, cánulas, dispositivos intrauterinos, equipos de radiología, delantales, entre otros.^{40,}
¹⁵¹ Debido a que todas las superficies antes mencionadas están en continuo contacto con fuerzas de rozamiento, es necesario que las mismas sean estables desde un punto de vista mecánico. Es decir, que puedan ser sumergidas en solventes polares sin destruirse y que soporten fuerzas de rozamiento sin que sea éste un motivo para perder el polímero antibacteriano depositado electroquímicamente sobre el ITO. La serie de superficies creadas en una primer instancia (TCP-C₆₀, TCP, ZnTCP/TCP y TCP/TCP-C₆₀) no resultaron estables mecánicamente dado que cuando se sumergieron en agua o etanol, algunas se despegaron de la superficie del ITO. Es por ello, que éste fue uno de los tantos motivos por el que se construyó una segunda serie de películas poliméricas antibacterianas (CBZTPA, ZnCBZTPA y ZnTCP-C₆₀) que resultaron más estables desde un punto de vista mecánico. Éstas se sumergieron en agua y etanol durante largos períodos de tiempo y las mismas no se despegaron del ITO. Es por ello, que fue posible avanzar con la investigación de superficies estériles, llevándose a cabo experimentos con biopelículas de *S. aureus* creciendo sobre los polímeros de fotosensibilizadores, para después inactivarlos con la irradiación con luz visible. Cabe destacar, que el procedimiento experimental lleva etapas de sonicado, que las nuevas superficies, ZnTCP-C₆₀, ZnCBZTPA y CBZTPA pudieron soportar sin que se perdiera el polímero electroquímico. De esta manera, fue posible lograr y estudiar un diseño experimental más próximo a la realidad de los hospitales, es decir distintas superficies con *S. aureus* creciendo en forma de biopelícula.

4.28.3. Reutilización de polímeros para la PDI de biopelículas de *S. aureus*

Los polímeros electroquímicos ZnCBZTPA y ZnCBZTPA/CBZTPA con absorbancias mayores a 0,5, resultaron ser las más eficientes para erradicar biopelículas de *S. aureus* (Figura N°71). Es por ello, que se evaluó si estas películas podían ser re-utilizadas luego de la PDI. Para tal fin, se repitió tres veces el tratamiento de inactivación empleando una misma superficie y utilizando exactamente la metodología experimental de inactivación desarrollada con la biopelícula de *S. aureus*. Los resultados que se muestran en la Tabla N°12, ponen de manifiesto que la eficiencia de la PDI no se ve disminuida de manera apreciable con las repeticiones en las medidas. Este resultado puede explicarse teniendo en cuenta que la biopelícula crece sobre el polímero electroquímico, por lo tanto, las ROS generadas por los fotosensibilizadores interaccionan preferentemente con la biopelícula y no

con el polímero electrodepositado. Por lo tanto, las superficies electroactivas se fotodegradan en menor medida con biopelículas de *S. aureus* creciendo sobre ellos que con el mismo microorganismo en fase planctónica o flotante libre (sección 4.23.).

Tabla N°12. Resultados de la reutilización de las superficies poliméricas ZnCBZTPA y ZnCBZTPA/CBZTPA para la PDI de biopelículas de *S. aureus* ($\sim 1 \times 10^8$ UFC/ml). $\lambda_{\text{irr}} = 350\text{-}800$ nm.

	ZnCBZTPA ^a			ZnCBZTPA/CBZTPA ^a		
	1 ^{er} uso (UFC/ml)	2 ^{do} uso (UFC/ml)	3 ^{er} uso (UFC/ml)	1 ^{er} uso (UFC/ml)	2 ^{do} uso (UFC/ml)	3 ^{er} uso (UFC/ml)
Control	7,33	7,26	6,34	7,33	7,26	6,34
$t_{\text{irr}} = 30$ min	7,33	7,26	6,29	6,38	6,55	5,24
$t_{\text{irr}} = 60$ min	4,80	5,01	4,18	5,49	5,80	4,78

^a $A^{\text{Soret}} = 0,5$; $\lambda_{\text{irr}} = 350\text{-}800$ nm.

En un trabajo previo, se prepararon películas porosas finas con forma de panal de abeja de tamaño micrométrico basadas en complejos híbridos formados mediante interacción electrostática entre *meso*-tetra(4-sulfonatofenil)porfirina coordinada con el metal Mn(III) (MnTPPS) y bromuro de dimetildioctadecilamonio (DODMABr).³³⁷ La morfología de las películas microporosas delgadas depende de la concentración de los complejos MnTPPS-DODMA, DODMABr y poliestireno (PS) que las conforman. Estas superficies poliméricas se construyeron para la erradicación de la bacteria Gram negativa *E. coli*. Las mismas inactivaron el 83% de las UFC. Sin embargo, cuando las superficies microporosas son irradiadas con luz visible durante 1 hora en ausencia de microorganismos, su estructura se degrada irreversiblemente (Figura N°64).³³⁷ Esto es ocasionado por las mismas ROS que producen la muerte de los microbios.

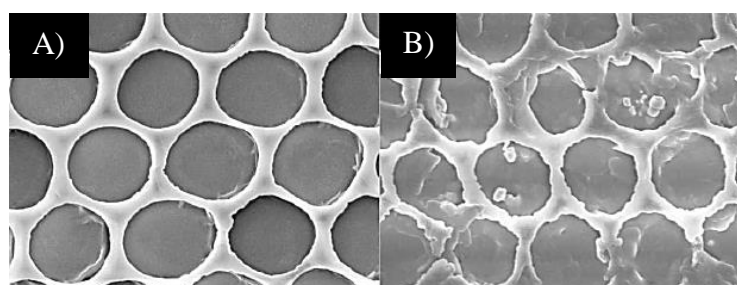
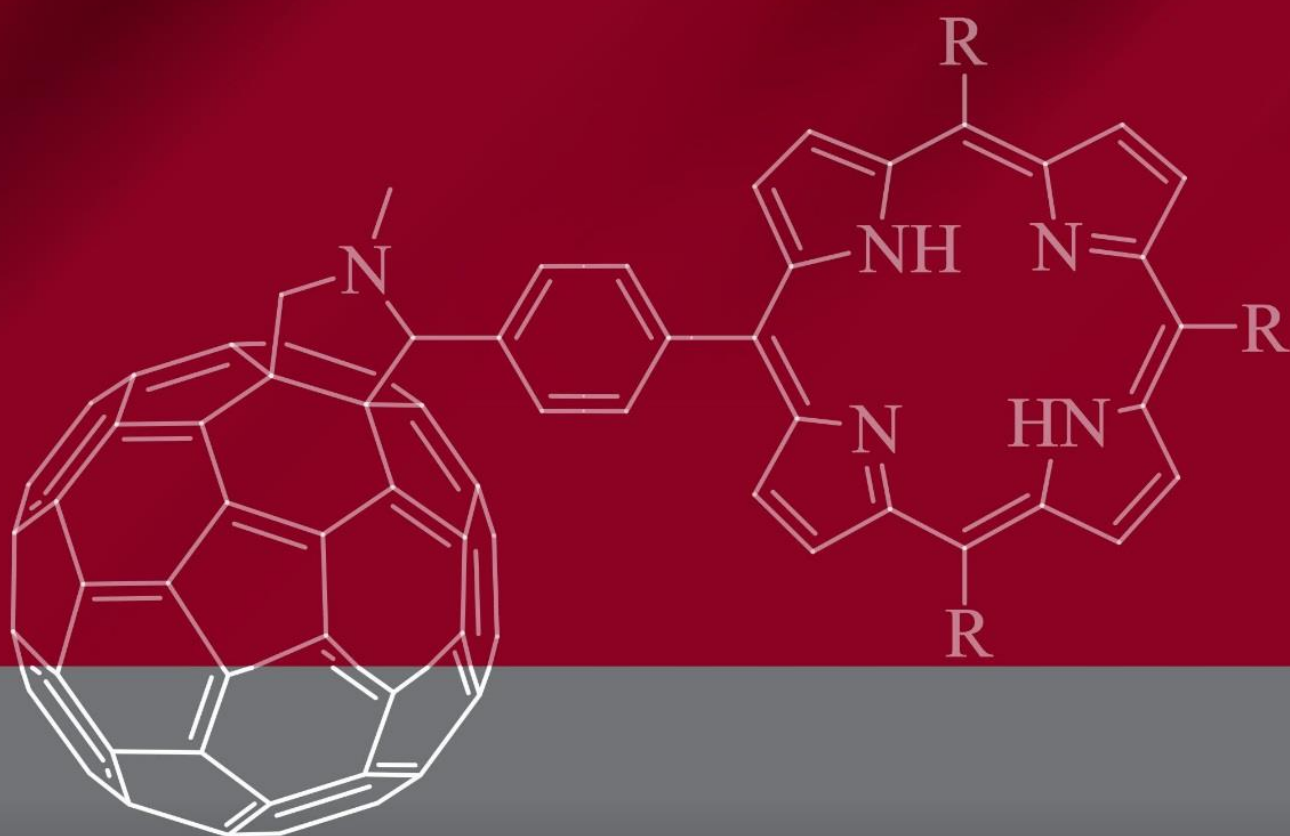


Figura N°74. Imágenes de las superficies microporosas con forma de panal de abejas tomadas con el microscopio electrónico de barrido (SEM). (A) Antes de la irradiación. (B) luego de 1 hora de irradiación con luz visible en solución de PBS.³³⁷

Ese mismo año, Felgenträger y col. inmovilizaron un derivado de *meso*-tetrafenilporfirina (TPP) sobre poliuretano (PU) después de ser pulverizado y polimerizado como una capa delgada sobre polimetilmetacrilato (PMMA).³⁶³ Estas superficies, se crearon

para la erradicación de microorganismos patógenos cuando son irradiadas con luz visible. Es por ello, que se estudió su fotoestabilidad. Es común que porfirinas como TPP se destruyan por las mismas ROS que generan. Este proceso puede ser ralentizado por complejos metálicos o por la ausencia de oxígeno.⁴⁸² Los autores, irradiaron la superficie TPP-OH en PU con una lámpara PIB 3000 en las mismas condiciones que emplearon para la erradicación de las bacterias. Se midieron y compararon los espectros de absorción UV-visible antes y después de la irradiación. La iluminación de las muestras, desde 5 hasta 60 min, no reveló ningún cambio en los espectros de absorción de las superficies dentro de la precisión experimental.³⁶³

Cabe destacar, que en función de cuál sea la metodología empleada para la construcción de las superficies antimicrobianas, cuán expuesta esté la superficie a las ROS y en qué estado se encuentre el microorganismo, fase flotante libre o en forma de biopelícula bacteriana, va a ser la fotoestabilidad de la superficie polimérica en cuestión.



CAPÍTULO V

Conclusiones

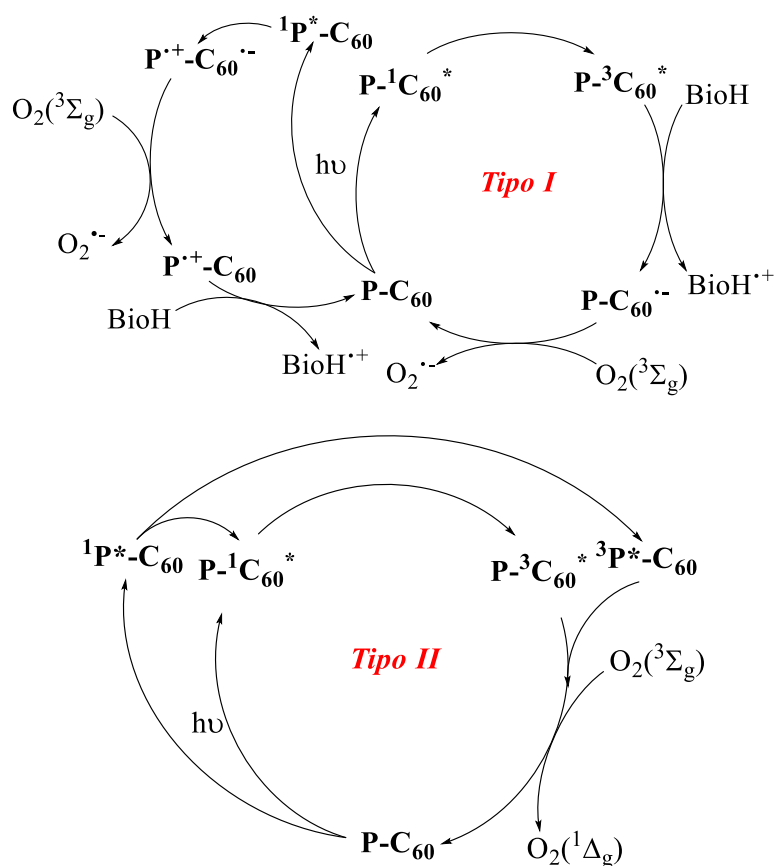
CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES

Se sintetizó una nueva díada porfirina-fullereno C_{60} , llamada TCP- C_{60} , en dos etapas fundamentales de reacción. El primer paso, consistió en la síntesis de una porfirina asimétrica AB_3 , a partir de la condensación del dipirrometano correspondiente con una mezcla binaria de aldehídos catalizada por ácido. La metodología de síntesis desarrollada en esta tesis, presenta ventajas en comparación con el método convencional, en el cual se hace reaccionar una mezcla binaria de aldehídos y pirrol, debido a que se obtiene un menor número de porfirinas y de productos secundarios derivados de la polimerización del pirrol. Por lo tanto, permite un proceso de purificación más simple y un rendimiento del producto de interés más elevado. En segundo lugar, se formó la díada TCP- C_{60} mediante una cicloadición 1,3-dipolar entre la porfirina con simetría AB_3 , con un grupo funcional aldehído, y el fullereno C_{60} . Este procedimiento de síntesis permite obtener el producto con rendimientos elevados. Finalmente, mediante una metilación exhaustiva se sintetizó TCP- C_{60}^{4+} , un fotosensibilizador con considerable carácter anfifílico. El procedimiento de metilación propuesto, asegura la producción de cargas positivas en el compuesto además de un proceso de purificación rápido y sencillo.

Los estudios espectroscópicos de absorción UV-visible indican que no hay interacción entre los cromóforos en el estado fundamental, mientras que la emisión de fluorescencia de la porfirina se encuentra fuertemente desactivada debido a la estructura del C_{60} . Las díadas sintetizadas poseen una alta capacidad para formar un estado de separación de carga fotoinducido ($TCP^{*+}-C_{60}^{-}$) lo cual se constató mediante estudios en presencia de un dador y un aceptor de electrones. Por lo tanto, la producción de $O_2(^1\Delta_g)$ por parte de estos compuestos depende fuertemente de la polaridad del medio. En un solvente más polar, como DMF, tanto TCP- C_{60} como TCP- C_{60}^{4+} se encuentran principalmente como monómeros y prácticamente no generan $O_2(^1\Delta_g)$ debido a la estabilización del estado de separación de carga (Esquema N°84). En cambio, en tolueno, un solvente no polar, la díada TCP- C_{60} produce $O_2(^1\Delta_g)$ con un rendimiento elevado, mientras que TCP- C_{60}^{4+} no lo hace debido a que se encuentra parcialmente agregada en tal solvente (Esquema N°84). Por otro lado, en un medio microheterogéneo, tal como micelas inversas de tolueno/AOT (0,1 M)/agua ($W_0=10$), aumenta la monomerización de TCP- C_{60}^{4+} . Al disminuir la agregación del fotosensibilizador en el sistema micelar, aumenta la producción de $O_2(^1\Delta_g)$ en comparación con el solvente no polar. También, estudios con NBT en presencia de un agente reductor biológico y Trp, ponen

de manifiesto que ambas díadas pueden ejercer una acción fotodinámica por ambos mecanismos fotodinámicos. Cabe destacar, que la eficiencia fotodinámica de los sensibilizadores en los sistemas biológicos, no es directamente predecible sobre la base de investigaciones fotofísicas en solución y que las díadas pueden generar diferentes ROS dependiendo principalmente de la polaridad del microambiente donde se localicen.



Esquema N°84. Mecanismos de fotosensibilización tipo I y tipo II para díadas porfirina-fullereno C_{60} .

Por otra parte, estudios de PDI *in vitro* indicaron que la inactivación de la bacteria Gram positiva *S. aureus*, es mayor cuando se emplea la díada catiónica que cuando se usa la estructura análoga sin cargas. Con $1\ \mu M$ de TCP- C_{60}^{4+} se logró una inactivación del 99,998% a los 30 min de irradiación. Este resultado pone de manifiesto, que los fotosensibilizadores con cargas positivas interactúan mejor con las paredes bacterianas y que el carácter anfifílico del fotosensibilizador catiónico, podría ayudar a los derivados del fullereno C_{60} a acumularse o a atravesar las membranas biológicas. Sin embargo, se logró una inactivación menos efectiva de la bacteria Gram negativa *E. coli*. Este tipo de microorganismo es más difícil de erradicar debido a la compleja estructura de su pared celular.

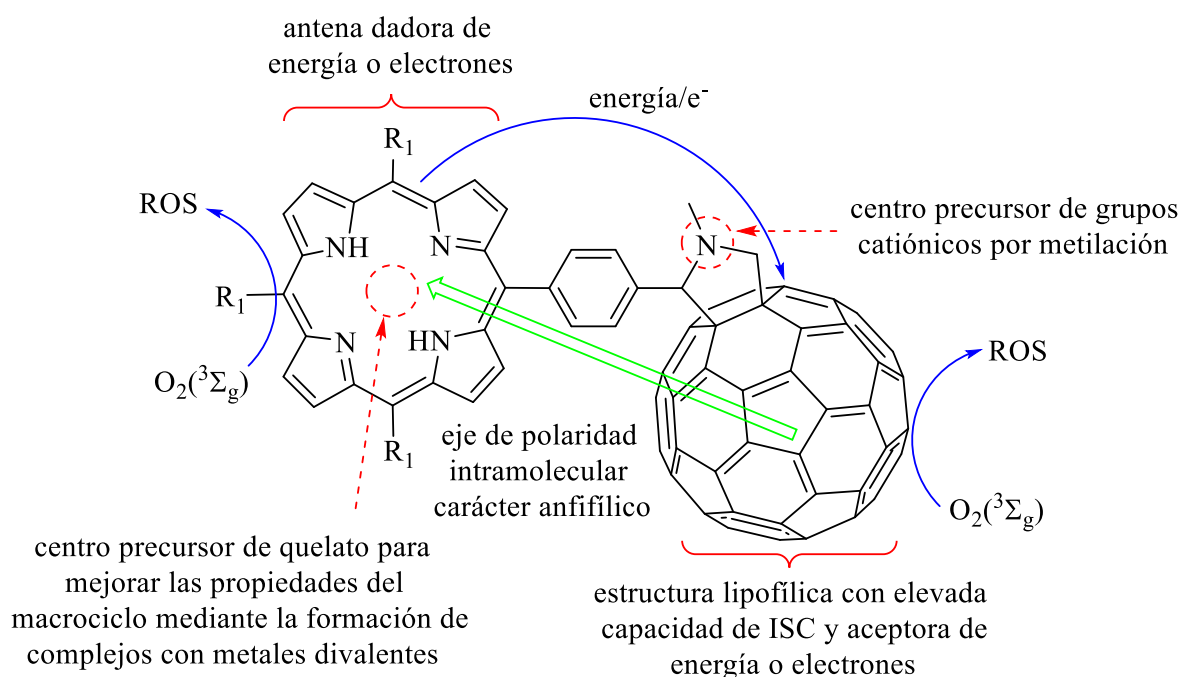
Además, se realizaron estudios tanto en medio homogéneo como *in vitro*, para tratar de dilucidar el mecanismo de acción fotodinámica que está implicado en la PDI de células de *S. aureus* fotosensibilizada por TCP-C₆₀ y TCP-C₆₀⁴⁺. De los estudios con Trp, como sustrato fotooxidable, y agregando distintos atrapadores de ROS en DMF se deduce que en ambas díadas existe una contribución importante del fotoproceso tipo I. En cambio, en el caso de la porfirina TCP el mecanismo de acción fotodinámico es fundamentalmente del tipo II. De los ensayos *in vitro*, se infiere que la muerte de las células microbianas, por parte de ambas díadas, se debe a una contribución de ambos mecanismos. En el caso de TCP-C₆₀, se observa un mayor aporte del tipo II, posiblemente debido a que se ubica en un ambiente celular poco polar lo que favorece la producción de O₂(¹Δ_g). Este resultado se confirmó al estudiar la fotooxidación de DMA en células de *S. aureus*.

Con el objetivo de buscar una díada eficiente para inactivar bacterias Gram negativas, se sintetizó una nueva díada porfirina-fullereno C₆₀, siguiendo una metodología similar a la empleada para TCP-C₆₀. Así, se obtuvo TAP-C₆₀ y mediante una metilación exhaustiva se sintetizó TAP-C₆₀⁴⁺, un fotosensibilizador con considerable carácter anfifílico. Los estudios espectroscópicos de absorción UV-visible indican que esta díada se encuentra agregada tanto en un solvente homogéneo como en micelas inversas de AOT. Los estudios fotodinámicos mostraron que TAP-C₆₀ y TAP-C₆₀⁴⁺ poseen una alta capacidad para producir O₂(¹Δ_g) en DMF. También, los resultados obtenidos de la fotooxidación del aminoácido Trp ponen en evidencia que las díadas pueden actuar por un mecanismo tipo I en un solvente polar.

Ensayos de PDI *in vitro* indicaron que la inactivación de la bacteria Gram positiva *S. aureus* fue mayor cuando se empleó la díada catiónica que cuando se usó la neutra. Con TAP-C₆₀⁴⁺ se logró una inactivación prácticamente completa a los 5 min de irradiación a una concentración de 1 μM. Este resultado pone de manifiesto, que los fotosensibilizadores con un elevado carácter anfifílico y con cargas positivas puntuales y móviles interactúan con las membranas biológicas de una manera más efectiva. También, se logró una inactivación elevada de la bacteria Gram negativa *E. coli* luego de 15 min de irradiación. Además, la inactivación de *S. aureus* inducida por estas díadas tiene lugar principalmente por una contribución de ambos mecanismos de acción fotodinámicos. En general, el tipo de fotoproceso involucrado depende de la polaridad del medio celular en el que se localicen los fotosensibilizadores. Así, en un entorno más polar, predomina la fotorreacción tipo I y en uno menos polar, la tipo II.

Estos resultados muestran que las díadas moleculares formadas por porfirinas unidas a fullereno C₆₀ ofrecen una arquitectura molecular prometedora para ser empleadas en la

inactivación de células microbianas. El Esquema N°85 resume las consideraciones que se tuvieron en cuenta a la hora de diseñar las díadas como potenciales fotosensibilizadores eficientes para la PDI.



Esquema N°85. Diseño de díadas porfirina-fullereno C_{60} como fotosensibilizadores para la PDI.

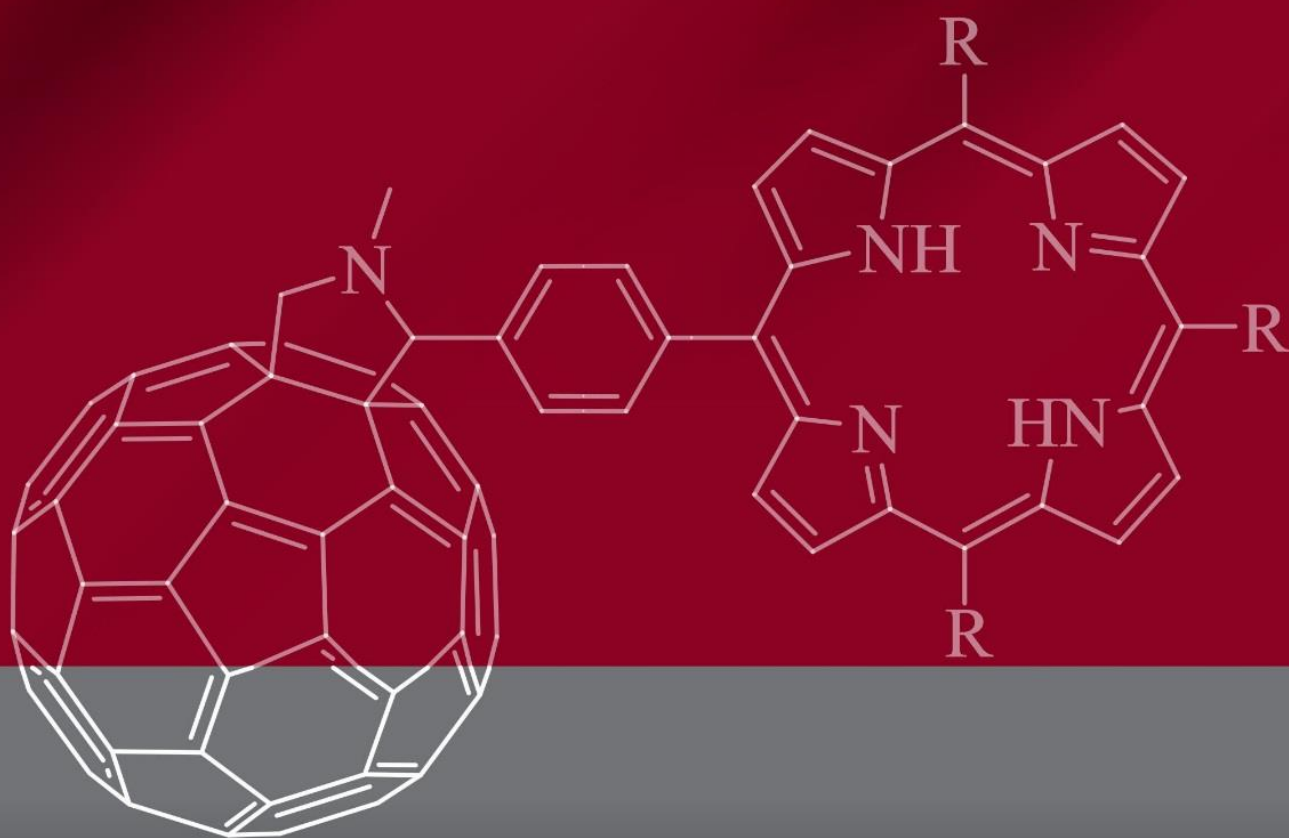
Con el propósito de obtener superficies fotoinactivantes, se fabricaron mediante voltametría cíclica películas antibacterianas formadas por los fotosensibilizadores TCP, ZnTCP y TCP- C_{60} . Esta metodología permite generar polímeros electroquímicos de una manera rápida y sencilla. Los estudios espectroscópicos de absorción UV-visible indican que las películas se formaron correctamente en la superficie del electrodo transparente de ITO. Además, permiten observar que las propiedades fotoquímicas características de los fotosensibilizadores no se perdieron al formar las películas. Mediante el uso de tres sustratos diferentes, ABMM, NBT/NADH y Trp, se estudió la capacidad de estas superficies para generar ROS. En todos los estudios se observó que la superficie formada por la díada TCP- C_{60} es la que presenta la mayor actividad fotodinámica. Por otro lado, la bicapa formada por TCP/ZnTCP no mostró una actividad fotodinámica considerable. De los estudios *in vitro*, se observó que la película de TCP- C_{60} es la más eficiente para inactivar tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas. Esta superficie produjo una disminución en la supervivencia de *S. aureus* de ~99,97% luego de 30 min de irradiación con luz visible. Esta metodología mejorada podría ser empleada para esterilizar superficies, principalmente en hospitales donde *S. aureus* es capaz de sobrevivir días y favorecer la infección de los pacientes. Por

otro lado, la película TCP-C₆₀ inactivó la bacteria Gram negativa *E. coli* en suspensiones celulares con una eficiencia del 99,98%, luego de ser irradiada durante 60 min. Esta tecnología podría ser aplicada para la desinfección de aguas residuales, dado que luego de la PDI, las mismas se podrían retirar del medio sin dejar residuos del fotosensibilizador. Sin embargo, es necesario continuar con los estudios para lograr que estas superficies puedan ser reutilizadas y estables mecánicamente dado que su construcción es costosa.

Por otro lado, para producir superficies capaces de inactivar biopelículas de bacterias Gram positivas, se obtuvieron mediante voltametría cíclica películas poliméricas formadas por los fotosensibilizadores CBZTPA, ZnCBZTPA y ZnTCP-C₆₀. Los estudios espectroscópicos de absorción UV-visible indican que los polímeros se formaron correctamente en la superficie del electrodo transparente de ITO. Además, en los mismos se observa que las propiedades fotoquímicas características de los fotosensibilizadores se conservaron al formar las películas. Mediante el uso del sustrato ABMM se analizó la capacidad de estas superficies para generar O₂(¹Δ_g). Se observó que la superficie formada por la díada ZnTCP-C₆₀ presenta la mayor actividad fotodinámica. De los estudios *in vitro*, se encontró que la película de ZnTCP-C₆₀ es la más eficiente para inactivar biopelículas de *S. aureus* a bajas absorbancias del fotosensibilizador en la superficie. Sin embargo, no se pueden obtener películas del polímero formado por la díada que superen absorbancias de ~0,1. Por el contrario, las superficies formadas por las porfirinas CBZTPA y ZnCBZTPA pueden alcanzar valores de absorbancia superiores a 0,4, resultando en un aumento en la eficiencia fotoinactivante de la biopelícula. Estos polímeros fotoactivos produjeron disminuciones en la viabilidad celular de la biopelícula en ~99,97% luego de 60 min de irradiación.

El ambiente hospitalario está comúnmente contaminado con posibles patógenos que representan un riesgo de transmisión cruzada a los pacientes. En la práctica, la limpieza manual de entornos complejos es difícil. Por lo tanto, nuevos enfoques se requieren para mantener condiciones asépticas. Esta investigación, presenta un ejemplo de un procedimiento conveniente para obtener películas electrogeneradas de díadas porfirina-fullereno C₆₀. Como observación final, cabe destacar que estas películas se pueden emplear de las siguientes maneras: a) para controlar la proliferación microbiana y mantener las condiciones de asepsia en las superficies implicadas en la asistencia sanitaria y, b) para la desinfección de medios acuosos. La principal ventaja de la erradicación heterogénea de microorganismos utilizando superficies antibacterianas, es que se puede quitar fácil y rápidamente después de la inactivación celular, evitando efectos fotodinámicos

permanentes. Además, los fotosensibilizadores pueden ser recuperados y reciclados produciendo una mínima contaminación ambiental. El desarrollo de esta nueva tecnología todavía enfrenta el reto principal de tener un material fotobactericida con actividad significativa y con el colorante presente a la concentración más baja posible, minimizando la lixiviación y con una durabilidad mejorada del material.



CAPÍTULO VI

Referencias Bibliográficas

CAPÍTULO VI

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Lovell, J. F.; Liu, T. W. B.; Chen, J.; Zheng, G., Activatable photosensitizers for imaging and therapy. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2839-2857.
2. Singh, S.; Aggarwal, A.; Bhupathiraju, N. V.; Arianna, G.; Tiwari, K.; Drain, C. M., Glycosylated porphyrins, phthalocyanines, and other porphyrinoids for diagnostics and therapeutics. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 10261-10306.
3. Kawczyk-Krupk, A.; Bugaj, A. M.; Latos, W.; Zaremba, K.; Wawrzyniec, K.; Kucharzewski, M.; Sierón, A., Photodynamic therapy in colorectal cancer treatment: the state of the art in clinical trials. *Photodiag. Photodyn. Ther.* **2015**, *12*, 545-553.
4. Quirk, B. J.; Brandal, G.; Donlon, S.; Vera, J. C.; Mang, T. S.; Foy, A. B.; Lew, S. M.; Girotti, A. W.; Jogal, S.; LaViolette, P. S.; Connelly, J. M.; Whelan, H. T., Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors - Where do we stand? *Photodiag. Photodyn. Ther.* **2015**, *12*, 530-544.
5. Yin, H.; Ye, X.; Li, Y.; Niu, Q.; Wang, C.; Ma, W., Evaluation of the effects of systemic photodynamic therapy in a rat model of acute myeloid leukemia. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2015**, *153*, 13-19.
6. Cisáriková, A.; Barbieriková, Z.; Janovec, L.; Imrich, J.; Hunáková, L.; Bacová, Z.; Paulíková, H., Acridin-3,6-dialkyldithiourea hydrochlorides as new photosensitizers for photodynamic therapy of mouse leukemia cells. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 2011-2022.
7. Oruba, Z.; Łabuz, P.; Macyk, W.; Chomyszyn-Gajewska, M., Antimicrobial photodynamic therapy-a discovery originating from the pre-antibiotic era in a novel periodontal therapy. *Photodiag. Photodyn. Ther.* **2015**, *12*, 612-618.
8. Bonnett, R., *Chemical aspects of photodynamic therapy*. Breach Science: Amsterdam, 2000.
9. Wainwright, W., Photoantimicrobials - a PACT against resistance and infection. *Drugs Future* **2004**, *29*, 85-93.
10. Smith, K. M., *Porphyrins and metalloporphyrins*. Elsevier: Amsterdam, 1975.

11. Wilson, M.; Burns, T.; Pratten, J.; Pearson, G. J., Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low power laser light in the presence of a photosensitizer. *J. Appl. Bacteriol.* **1995**, 78 (5), 569-574.
12. Merchat, M.; Bertolini, G.; Giacomini, P.; Villaneuva, A.; Jori, G., Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Photochem. Photobio. B* **1996**, 32 (3), 153-157.
13. Minnock, A.; Vernon, D. I.; Schofield, J.; Griffiths, J. J. H. P.; Brown, S. B., Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B* **1996**, 32 (3), 159-164.
14. Theuretzbacher, U., Global antibacterial resistance: the never-ending story. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2013**, 1 (2), 63-69.
15. WHO, Antimicrobial resistance: global report on surveillance. In *Drug Resistance* [Online] France ed.; Organization, W. H., Ed. Switzerland, 2014.
16. Smith, T. L.; Pearson, M. L.; Wilcox, K. R.; Cruz, C.; Lancaster, M. V.; Robinson-Dunn, B.; Tenover, F. C.; Zervos, M. J.; Band, J. D.; White, E.; Jarvis, W. R., Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Engl. J. Med. N.* **1999**, 340 (7), 493-501.
17. Dai, T.; Huang, Y. Y.; Hamblin, M. R., Photodynamic therapy for localized infections-state of the art. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2009**, 6, 170-188.
18. Diaz Granados, C. A.; Cardo, D. M.; McGowan, J. E., Antimicrobial resistance: international control strategies, with a focus on limited-resource settings. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2008**, 32, 1-9.
19. Rodríguez-Rojas, A.; Rodríguez-Beltrán, J.; Couce, A.; Blázquez, J., Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. *Int. J. Med. Microbiol.* **2013**, 303, 293-297.
20. Cota-Rubio, E.; Hurtado-Ayala, L.; Pérez-Morales, E.; Alcántara-Jurado, L., Resistencia a antibióticos de cepas bacterianas aisladas de animales destinados al consumo humano. *Re. Ib. Ci.* **2014**, 1, 75-85.
21. Safdar, N.; Maki, D. G., The commonality of risk factors for nosocomial colonization and infection with antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus*, *enterococcus*, gram-

negative bacilli, *Clostridium difficile*, and *Candida*. *Ann. Intern. Med.* **2002**, 136 (11), 834-844.

22. Nounou, B.; Cattáneo, M. E.; Salmón, R.; Palasezze, L.; Boccaleri, J.; Cestona, E.; Bedecarrás, F.; Ranieri, F.; Talevi, A.; Muñoz, S. M., Estudio sobre el consumo y la automedicación con antibióticos en la ciudad de La Plata (Buenos Aires, Argentina). *Lat. Am. J. Pharm.* **2009**, 28 (4), 544-551.

23. Fleming, A., On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. Influenzae*. *Brit. J. Exp. Pathol.* **1929**, 10, 226-236.

24. Aronson, J. K., Beta-lactam antibiotics. In *The international encyclopedia of adverse drug reactions and interactions*, 16th ed.; El Sevier: 2016; pp 928–956.

25. Fleming, A. *Penicillin nobel lecture*; December 11, 1945; pp 83-93.

26. Allegranzi, B.; Nejad, S. B.; Castillejos, G. G.; Kilpatrick, C.; Kelley, E.; Mathai, E. *Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide*; Ginebra, Suiza, 2011; p 34.

27. Sosa, A. J., *Antimicrobial resistance in developing countries*. New York, 2010; Vol. 3.

28. Sader, H. S.; Jones, R. N.; Gales, A. C.; Silva, J. B.; Pignatari, A. C., SENTRY antimicrobial surveillance program report: latin american and brazilian results for 1997 through 2001. *Braz. J. Infect. Dis.* **2004**, 8 (1), 25-79.

29. Villegas, M. V.; Kattan, J. N.; Quinteros, M. G.; Casellas, J. M., Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in South America. *Clin. Microbiol Infect.* **2008**, 14 (1), 154-158.

30. De Lencastre, H.; Oliveira, D.; Tomasz, A., Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. *Curr. Opin. Microbiol.* **2007**, 10 (5), 428-435.

31. Diekema, D. J.; BootsMiller, B. J.; Vaughn, T. E.; Woolson, R. F.; W., Y. J.; Ernst, E. J.; Flach, S. D.; Ward, M. M.; Franciscus, C. L.; Pfaller, M. A.; Doebbeling, B. N., Antimicrobial resistance trends and outbreak frequency in United States hospitals. *Clin. Infect. Dis.* **2004**, 38 (1), 78-85.

32. Cosgrove, S. E.; Sakoulas, G.; Perencevich, E. N.; Schwaber, M. J.; Karchmer, A. W.; Carmeli, Y., Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* **2003**, *36*, 53-59.
33. Yang, Y.; McBride, M. V.; Rodvold, K. A.; Tverdek, F.; Trese, A. M.; Hennenfent, J.; Schiff, G.; Lambert, L. B.; Schumock, G. T., Hospital policies and practices on prevention and treatment of infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am. J. Health Syst. Pharm.* **2010**, *67*, 1017-1024.
34. Siegel, J. D.; Rhinehart, E.; Jackson, M.; Chiarello, L., Management of multidrug-resistant organisms in health care settings. *Am. J. Infect. Control* **2007**, *35* (2), 65-93.
35. McDanel, J. S.; Ward, M. A.; Leder, L.; Schweizer, M. L.; Dawson, J. D.; Diekema, D. J.; Smith, T. C.; Chrischilles, E. A.; Perencevich, E. N.; Herwaldt, L. A., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prevention practices in hospitals throughout a rural state. *Am. J. Infect. Control* **2014**, *42*, 868-873.
36. Campanile, F.; Bongiorno, D.; Perez, M.; Mongelli, G.; Sessa, L.; Benvenuto, S.; Gona, F.; Varaldo, P. E.; Stefani, S., Epidemiology of *Staphylococcus aureus* in Italy: first nationwide survey, 2012. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2015**, *3*, 247-254.
37. Toledo, P. V. M.; Arend, L. N.; Pilonetto, M.; Costa Oliveira, J. C.; Luhm, K. R., Surveillance programme for multidrug-resistant bacteria in healthcare-associated infections: an urban perspective in South Brazil. *J. Hosp. Infect.* **2012**, *80*, 351-353.
38. Egyir, B.; Guardabassi, L.; Nielsen, S. S.; Larsen, J.; Addo, K. K.; Newmane, M. J.; Larsen, A. R., Prevalence of nasal carriage and diversity of *Staphylococcus aureus* among inpatients and hospital staff at Korle Bu Teaching Hospital, Ghana. *J. Global Antimicrob. Resist.* **2013**, *1*, 189-193.
39. Creamer, E.; Shore, A. C.; Deasy, E. C.; Galvin, S.; Dolan, A.; Walley, N.; McHugh, S.; Fitzgerald-Hughes, D.; Sullivan, D. J.; Cunney, R.; Coleman, D. C.; Humphreys, H., Air and surface contamination patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on eight acute hospital wards. *J. Hosp. Infect.* **2014**, *86*, 201-208.
40. Shelly, M. J.; Scanlon, T. G.; Ruddy, R.; Hannan, M. M.; Murray, J. G., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) environmental contamination in a radiology department. *Clin. Radiol.* **2011**, *66*, 861-864.

41. Lawes, T.; Lopez-Lozano, J. M.; Nebot, C. A.; Macartney, G.; Subbarao-Sharma, R.; Dare, C. R. J.; Wares, K. D.; Gould, I. M., Effects of national antibiotic stewardship and infection control strategies on hospital-associated and community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections across a region of Scotland: a non-linear time-series study. *Lancet Infect. Dis.* **2015**, *15*, 1438-1449.
42. Patharea, N. A.; Asogana, H.; Tejanía, S.; Al Mahruqia, G.; Al Fakhria, S.; Zafarullaa, R.; Pathareb, A. V., Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [MRSA] colonization or carriage among health care workers. *J. Infect Public Health.* **2016**, *9* (5).
43. Suzuki, H.; Hase, R.; Otsuka, Y.; Hosokawa, N., Bloodstream infections caused by *Streptococcus anginosus* group bacteria: A retrospective analysis of 78 cases at a Japanese tertiary hospital. *J. Infect. Chemother.* **2016**, *22* (7), 456-460.
44. Londoño Restrepo, J.; Macías Ospina, I. C.; Ochoa Jaramillo, F. L., Factores de riesgo asociados a infecciones por bacterias multirresistentes derivadas de la atención en salud en una institución hospitalaria de la ciudad de Medellín 2011-2014. *Infectio* **2016**, *20* (2), 77-83.
45. Yasmin, M.; Hage, H. E.; Obeid, R.; Phil, M.; Haddad, E. H.; Zaarour, M.; Khalil, A., Epidemiology of bloodstream infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a tertiary care hospital in New York. *Am. J. Infect. Control* **2016**, *44*, 41-46.
46. Reynaldo, M. B.; Flores, M. B.; Caetano, J. A. V.; Magariños, M. C., Eficacia de algunos biocidas contra estafilococos hospitalarios sensibles y resistentes a la meticilina en la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Rev. Panam Salud Pública* **2004**, *16* (3), 187-192.
47. Paganini, H.; Verdaguer, V.; Rodríguez, A. C.; Della Latta, P.; Hernández, C.; Berberian, G.; Pinheiro, J. L.; Rosanova, M. T., Infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina en niños provenientes de la comunidad en niños de la Argentina. *Arch. Argent. Pediatr.* **2006**, *104* (4), 295-300.
48. Rodríguez, C. H.; García, S.; Barberis, C.; Saposnik, E.; Weyland, B.; Nastro, M.; Losada, M.; Perazzi, B.; Almuzara, M.; Focoli, M.; Vay, C.; Famiglietti, A., Enterococcus spp.: antimicrobial resistance in hospital-acquired infections. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* **2013**, *47* (1), 155-160.

49. Verolo, C.; Viera, J.; Pivel, L., Prevalencia de la resistencia bacteriana en flora bucal en niños de 4 a 8 años. *Odontoestomatología* **2010**, *12* (16), 51-59.
50. Fosch, S.; Yones, C.; Trossero, M.; Grosso, O.; Nepote, A., Portación nasal de *Staphylococcus aureus* en individuos de la comunidad: factores epidemiológicos. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* **2012**, *46* (1), 59-68.
51. Hamblin, M. R.; Hasan, T., Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3* (5), 436-450.
52. Nigam, A.; Gupta, D.; Sharma, A., Treatment of infectious disease: antibiotics and beyond. *Microbiol. Res.* **2014**, *169*, 643-651.
53. Rios, A. C.; Moutinho, C. G.; Pinto, F. C.; Del Fiol, F. S.; Jozala, A.; Chaud, M. V.; Vila, M. M. D. C.; Teixeira, J. A.; Balcão, V. M., Alternatives to overcoming bacterial resistances: state-of-the-art. *Microbiol. Res.* **2016**, *191*, 51-80.
54. Chiosis, G.; Boneca, I. G., Selective cleavage of D-ala-D-lac by small molecules: re-sensitizing resistant bacteria to vancomycin. *Science* **2001**, *293*, 1484-1487.
55. Sulakvelidze, A.; Alavidze, A. Z.; Morris, J. G., Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 649-659.
56. Cleveland, J.; Montville, T. J.; Nes, I. F.; Chikindas, M. L., Bacteriocins safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *71*, 1-20.
57. Williams, J. D., The Garrod lecture. Selective toxicity and concordant pharmacodynamics of antibiotics and other drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* **1995**, *35*, 721-737.
58. Kristiansen, J. E., The antimicrobial activity of psychotropic drugs and stereoisomeric analogues. *Dan. Med. Bull.* **1990**, *37*, 165-182.
59. Jones, G. R. N., Successful cancer therapy with promethazine: the rationale. *Med. Hypotheses* **1996**, *46*, 25-29.
60. Kristiansen, J. E.; Amaral, L., The potential management of resistant infections with non-antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **1997**, *40*, 319-327.
61. Maisch, T.; Szeimies, R.-M.; Jori, G.; Abels, C., Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 907-917.

62. Jori, G.; Brown, S. B., Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, 3 (5), 403-405.
63. Oleinick, N.; Morris, R. L.; Belichenko, I., The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, 1, 1-21.
64. Nowak-Stepniowska, A.; Maleki, M.; Wiktorska, K.; Romiszewska, A.; Padzik-Graczyk, A., Inhibition of cell growth induced by photosensitizer PP(Arg)2-mediated photodynamic therapy in human breast and prostate cancer. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2011**, 8, 39-48.
65. Freitas, L. F.; Hamblin, M. R., Antimicrobial photoinactivation with functionalized fullerenes. In *Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy*, Elsevier Inc.: 2016.
66. Soncin, M.; Fabris, C.; Buseti, A.; Dei, D.; Nistri, D.; Roncucci, G., Approaches to selectivity in the n(II)-phthalocyanine photosensitized inactivation of wild type and antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, 1, 815-819.
67. Gad, F.; Zahra, T.; Francis, K. P.; Hasan, T.; Hamblin, M. R., Targeted photodynamic therapy of established soft tissue infections in mice. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, 3, 451-458.
68. Meng, S.; Xu, Z.; Hong, G.; Zhao, L.; Zhao, Z.; Guo, J.; Ji, H.; Liu, T., Synthesis, characterization and *in vitro* photodynamic antimicrobial activity of basic amino acideporphyrin conjugates. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 92, 35-48.
69. Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; R., H. M.; A., J.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Mroz, P.; Nowis, D.; Piette, J.; Wilson, B. C.; Golab, J., Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J. Clin.* **2011**, 61, 250-281.
70. Hamblin, M. R.; Jori, G., Photodynamic Inactivation of microbial pathogens: medical and environmental applications. In *Comprehensive series in photochemistry and photobiology*, Photobiology, E. S., Ed. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2011; Vol. 11.
71. Yin, R.; Dai, T.; Avci, P.; Serafim, A. E.; Melo, W.; Vecchio, D.; Huang, Y. Y.; Gupta, A.; Hamblin, M. R., Light based anti-infectives: ultraviolet C irradiation, photodynamic therapy, blue light, and beyond. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2013**, 13, 731-762.

72. Sharma, S. K.; Mroz, P.; Dai, T.; Huang, Y. Y.; Denis, T. G. S.; Hamblin, M. R., Photodynamic therapy for cancer and for infections: what is the difference? *Isr. J. Chem.* **2012**, 52, 1-15.
73. Alves, E.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Cunha, A.; Nadais, H.; Almeida, A., Potencial applications of porphyrins un photodynamic inactivation beyond the medical scope. *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* **2015**, 22, 34-57.
74. Maisch, T., Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? *Lasers Med. Sci.* **2007**, 22, 83-91.
75. Durantini, E. N., Photodynamic inactivation of bacteria. *Curr. Bioact. Compd.* **2006**, 2, 127-142.
76. O'Riordan, K.; Akilov, O. E.; Hasan, T., The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiag. Photodyn. Therapy* **2005**, 2 (4), 247-262.
77. Lauro, F. M.; Pretto, P.; Covolo, L.; Jori, G.; Bertoloni, G., Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycenepolylysine conjugates. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, 1, 468-470.
78. Huang, L.; Terakawa, M.; Zhiyentayev, T.; Huang, Y. Y.; Sawayama, Y.; Jahnke, A.; Tegos, G. P.; Wharton, T.; Hamblin, M. R., Innovative cationic fullerenes as broadspectrum light-activated antimicrobials. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2010**, 6, 442-452.
79. Giuliani, F.; Martinelli, M.; Cocchi, A.; Arbia, D.; Fantetti, L.; Roncucci, G., In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54 (2), 637-642.
80. Zeina, B.; Greenman, J.; Corry, D.; Purcell, W. M., Antimicrobial photodynamic therapy: assessment of genotoxic effects on keratinocytes *in vitro*. *Br. J. Dermatol.* **2003**, 148 (2), 229-232.
81. Mora, S. J.; Cormick, M. P.; Milanesio, M. E.; Durantini, E. N., The photodynamic activity of a novel porphyrin derivative bearing a fluconazole structure in different media and against *Candida albicans*. *Dyes Pigm.* **2010**, 87, 234-240.
82. Cormick, M. P.; Rovera, M.; Durantini, E. N., Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of a novel Zn(II) phthalocyanine substituted by fluconazole groups. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2008**, 194, 220-229.

83. Quiroga, E. D.; Mora, S. J.; Alvarez, M. G.; Durantini, E. N., Photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a tetracationic tentacle porphyrin and its analogue without intrinsic charges in presence of fluconazole. *Photodiag. Photodyn. Ther.* **2016**, *13*, 334-340.
84. Simonetti, O.; Cirioni, O.; Orlando, F.; Alongi, C.; Lucarini, G.; Silvestri, C.; Zizzi, A.; Fantetti, L.; Roncucci, G.; Giacometti, A.; Offidani, A.; Provinciali, M., Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy with a single treatment of RLP068/Cl in an experimental model of *Staphylococcus aureus* wound infection. *Br. J. Dermatol.* **2011**, *164*, 987-995.
85. Yin, R.; Wang, M.; Huang, Y.-Y.; Landi, G.; Vecchio, D.; Chiang, L. Y.; Hamblin, M. R., Antimicrobial photodynamic inactivation with decacationic functionalized fullerenes: oxygen-independent photokilling in presence of azide and new mechanistic insights. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *79*, 14-27.
86. Bae, B.; Yang, S.-G.; Jeong, S.; Lee, D. H.; Na, K.; Kim, J. M.; Costamagna, G.; Kozarek, R. A.; Isayama, H.; Deviere, J.; Seo, D. W.; Reddy, D. N., Polymeric photosensitizer-embedded self-expanding metal stent for repeatable endoscopic photodynamic therapy of cholangiocarcinoma. *Biomaterials* **2014**, *35*, 8487-8495.
87. Caminos, D. A.; Durantini, E. N., Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* immobilized on agar surfaces by a tricationic porphyrin. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 4253-4259.
88. Biel, M. A., Spatial orientation and light sources and method of using same for medical diagnosis and photodynamic therapy. Google Patents: 2000.
89. Cheng, X.; Guan, S.; Lu, H.; Zhao, C.; Chen, X.; Li, N.; Bai, Q.; Tian, Y.; Yu, Q., Evaluation of the bactericidal effect of Nd:YAG, Er:YAG, Er,Cr:YSGG laser radiation, and antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in experimentally infected root canals. *Lasers Surg. Med.* **2012**, *10*, 824-831.
90. Szacilowski, K.; Macyk, W.; Drzewiecka-Matuszek, A.; Brindell, M.; Stochel, G., Bioinorganic photochemistry: frontiers and mechanisms. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *105*, 2647-2694.
91. Vakrat-Haglili, Y.; Weiner, L.; Brumfeld, V.; Brandis, A.; Salomon, Y.; McLlroy, B.; Wilson, B. C.; Pawlak, A.; Rozanowska, M.; Sarna, T.; Scherz, A., The

microenvironment effect on the generation of reactive oxygen species by Pd-bacteriopheophorbide. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6487-6497.

92. Greer, A.; Foote, C., Discovery of the role of singlet oxygen [$^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$)] in photosensitized oxidation reactions. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 797-804.

93. Tanielian, C.; Mechin, R.; Seghrouchni, R.; Schweitzer, C., Mechanistic and kinetic aspects of photosensitization in the presence of oxygen. *Photochem. Photobiol.* **2000**, *71*, 12-19.

94. Petroselli, G.; Dántola, M. L.; Cabrerizo, F. M.; Capparelli, A. L.; Lorente, C.; Oliveros, E.; Thomas, A. H., Oxidation of 2'-deoxyguanosine 5'-monophosphate photoinduced by pterin: type I versus type II mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3001-3011.

95. Zhang, X.-F.; Guo, W., Imidazole functionalized magnesium phthalocyanine photosensitizer: modified photophysics, singlet oxygen generation and photooxidation mechanism. *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116*, 7651-7657.

96. Huang, L.; Xuan, Y.; Koide, Y.; Zhiyentayev, T.; Tanaka, M.; Hamblin, M. R., Type I and type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an in-vitro study on Gram-negative and gram-positive bacteria. *Lasers Surg. Med.* **2012**, *44*, 490-499.

97. Castano, A.; Demidova, T.; Hamblin, M. R., Mechanisms in photodynamic therapy: part one photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiag. Photodyn. Ther.* **2004**, *1*, 279-293.

98. Singleton, D. A.; Hang, C.; Szymanski, M. J.; Meyer, M. P.; Leach, A. G.; Kuwata, K. T.; Chen, J. S.; Greer, A.; Foote, C. S.; Houk, K. N., Mechanism of ene reactions of singlet oxygen. A two step no intermediate mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1319-1328.

99. Wu, L.; Hong, T. Y.; Vogt, F. G., Structural analysis of photo-degradation in thiazole containing compounds by LC-MS/MS and NMR. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *44*, 763-772.

100. Reddy, A. R.; Bendikov, M., Diels-Alder reaction of acenes with singlet and triplet oxygen - theoretical study of two-state reactivity. *Chem. Commun.* **2006**, *0* (11), 1179-1181.

101. Davis, M. J., Singlet oxygen mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *305*, 761-770.

102. Silvester, J. A.; Timmins, G. S.; Davies, M. J., Protein hydroperoxides and carbonyl groups generated by porphyrin induced photo-oxidation of bovine serum albumin. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *350*, 249-258.
103. Lledias, F.; Hansberg, W., Oxidation of human catalase by singlet oxygen in myeloid leukemia cells. *Photochem. Photobiol.* **1999**, *70*, 887-892.
104. Korytowski, W.; Girotti, A. W., Singlet oxygen adducts of cholesterol: photogeneration and reductive turnover in membrane systems. *Photochem. Photobiol.* **1999**, *70*, 484-489.
105. Cadet, J.; Ravanat, J. L.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P., Singlet oxygen oxidation of isolated and cellular DNA: product formation and mechanistic insights. *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82*, 1219-1225.
106. Stockert, J. C.; Juarranz, A.; Villanueva, A.; Nonell, S.; Horobin, R. W.; Soltermann, A. T.; Durantini, E. N.; Rivarola, V.; Colombo, L. L.; Espada, J.; Cañete, M., Photodynamic Therapy: selective uptake of photosensitizing drugs into tumor cells. *Curr. Topics Pharmacol.* **2004**, *8*, 185-217.
107. Leach, A. G.; Houk, K. N., Diels-Alder and ene reactions of singlet oxygen, nitroso compounds and triazolinones: transition states and mechanisms from contemporary theory. *Chem. Commun.* **2002**, *0* (12), 1243-1255.
108. Fudickar, W.; Linker, T., Remote substituent effects on the photooxygenation of 9,10-diarylanthracenes: strong evidence for polar intermediates. *Chem. Commun.* **2008**, *15*, 1771-1773.
109. Fudickar, W.; Linker, T., Intermediates in the formation and thermolysis of peroxides from oxidations with singlet oxygen. *Aust. J. Chem.* **2013**, *67*, 320-327.
110. McCallum, J. E. B.; Kuniyoshi, C. Y.; Foote, C. S., Characterization of 5-hydroxy-8-oxo-7,8-dihydroguanosine in the photosensitized oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanosine and its rearrangement to spiroiminodihydantoin. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16777-16782.
111. Friedrich, C. L.; Moyles, D.; Beveridge, T. J.; Hancock, R. E. W., Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on Gram-positive bacteria. *Antimicrob. Agents Ch.* **2000**, *44* (8), 2086-2092.

112. Jori, G.; Fbris, C.; Soncin, M.; Ferro, S.; Coppelotti, O.; Dei, D.; Fantetti, L.; Chiti, G.; Roncucci, G., Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg. Med.* **2006**, *38*, 468-481.
113. Nikaido, H., Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **1994**, *44*, 382-388.
114. Leive, L., The barrier function of the Gram-negative envelope. *Ann. NY Acad. Sci.* **1974**, *235* (1), 109-129.
115. Klaenhammer, T. R., Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **1993**, *12*, 39-85.
116. Stiles, M. E.; Hastings, J. W., Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential foruse in meat preservation. *Food Sci. Technol.* **1991**, *2*, 235-263.
117. Lambrechts, S. A. G.; Aalders, M. C. G.; Marle, J. V., Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49* (5), 2026-2034.
118. Bhatti, M.; Nair, S. P.; McRobert, A. J.; Henderson, B.; Shepherd, P.; Cridland, J.; Wilson, M., Identification of photolabile outer membrane proteins of porphyromonas gingivalis. *Curr. Microbiol.* **2001**, *43*, 96-99.
119. Salmon-Divon, M.; Nitzan, Y.; Malik, Z., Mechanistic aspects of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by cationic tetra-meso(*N*-methyl-pyridyl)porphine. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 423-429.
120. Tavares, A.; Carvalho, C. M. B.; Faustino, M. A.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, J. P. C.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, Â.; Gomes, N. C. M.; Alves, E.; Almeida, A., Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. *Mar. Drugs* **2010**, *8* (1), 91-105.
121. Costa, L.; Tomé, J. P. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Faustino, M. A. F.; Cunha, Â.; Gomes, N. C. M.; Almeida, A., Evaluation of resistance development and viability recovery by a non-enveloped virus after repeated cycles of aPDT. *Antiviral Res.* **2011**, *91*, 278-282.
122. Morley, S.; Griffiths, J.; Philips, G.; Moseley, H.; O'Grady, C.; Mellish, K.; Lankester, C. L.; Faris, B.; Young, R. J.; Brown, S. B.; Rhodes, L. E., Phase IIa randomized, placebo-controlled study of antimicrobial photodynamic therapy in bacterially colonized,

chronic leg ulcers and diabetic foot ulcers: a new approach to antimicrobial therapy. *Br. J. Dermatol.* **2013**, *168*, 617-624.

123. Gillaspay, A. F.; Iandolo, J. J.; Tang, Y. W.; Stratton, C. W., *Encyclopedia of microbiology*. Third Edition ed.; 2009; p 293-303.

124. Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Janda, W. M.; Schreck enberger, P. C.; Winn, W. C., Diagnóstico microbiológico. Panamericana, Ed. Bs. As, Argentina, 1999.

125. Cegelski, L.; Smith, C. L.; Hultgren, S. J., *Reference module in biomedical sciences*. Third Edition ed.; 2009; p 1-10.

126. Kluytmans, J.; van Belkum, A.; Verbrugh, H., Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.* **1997**, *10*, 505-520.

127. Iwase, T.; Uehara, Y.; Shinji, H., *Staphylococcus epidermidis* inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature* **2010**, *465*, 346-349.

128. DeLeo, F. R.; Otto, M.; Kreiswirth, B. N.; Chambers, H. F., Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **2010**, *375*, 1557-1568.

129. Chambers, H. F.; DeLeo, R. F., Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 629-641.

130. Ross, S.; Rodríguez, W.; Controni, G.; Khan, W., Staphylococcal susceptibility to penicillin G: the changing pattern among community isolates. *JAMA* **1974**, *229*, 1075-1077.

131. (CDC), C. f. D. C., Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: Michigan. *MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.* **1981**, *30* (16), 185-187.

132. Chambers, H. F., The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg. Infect. Dis.* **2001**, *7* (2), 178-182.

133. Lee, A. S.; Huttner, B.; Harbarth, S., Prevention and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in acute care settings. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2016**, *30* (4), 931-952.

134. Stefani, S.; Goglio, A., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: related infections and antibiotic resistance. *Int. J. Infect. Dis.* **2010**, *14*, 19-22.

135. Williams, C.; Davis, D. L., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* fomite survival. *Clin. Lab. Sci.* **2009**, *22*, 34-38.
136. Ganz, R. A.; Viveiros, J.; Ahmadi, A.; Khalil, A.; Tolckoff, M. J.; Nishioka, N. S.; Hamblin, M. R., Helicobacter pylori in patients can be killed by visible light. *Lasers Surg. Med.* **2005**, *36*, 260-265.
137. Nitzan, Y.; Salmon-Divon, M.; Shporen, E.; Malik, Z., ALA-induced photodynamic effects on Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 430-435.
138. Guffey, J. S.; Wilborn, J., *In vitro* bactericidal effects of 405 nm and 470 nm blue light. *Photomed. Laser Surg.* **2006**, *24*, 684-688.
139. Durantini, E. N., New insights into the antimicrobial blue light inactivation of *Candida albicans*. *Virulence* **2016**, *7*, 493-494.
140. Maclean, M.; MacGregor, S. J.; Anderson, J. G.; Woolsey, G. A., The role of oxygen in the visible light inactivation of *Staphylococcus aureus*. *J. Photochem. Photobiol. B* **2008**, *92*, 180-184.
141. Blattner, F. R.; Plunkett, I. G.; Bloch, C. A.; Perna, N. T.; Burland, V.; Riley, M.; Collado-Vides, J.; Glasner, J. D.; Rode, C. K.; Mayhew, G. F.; Gregor, J.; Davis, N. W.; Kirkpatrick, H. A.; Goeden, M. A.; Rose, D. J.; Mau, B.; Shao, Y., The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **1997**, *277*, 1453-1462.
142. Papadopoulos, D.; Scheinder, D. S.; Meier-Eiss, J.; Arber, W.; Lenski, R.; Blot, M., Genomic evolution during a 10.000 generation experiment with bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 3807-3812.
143. Hernández, A. L.; Valdés, M. M.; Vivanco, D.; Silva, J. L. Z., Microbiología y parasitología médicas. In *Capítulo 26 - Enterobacterias* [Online] Médicas, C., Ed. El Vedado, Ciudad de la Habana, Cuba, 2001; pp. 251-280.
144. Brenner, B., *Manual of systematic bacteriology*. Baltimore, USA, 1984; Vol. 1.
145. Li, X. Z.; Plésiat, P.; Nikaido, H., The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28* (2), 337-418.
146. Batoni, G.; Maisetta, G.; Esin, S., Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1858*, 1044-1060.

147. Costerton, J. W.; Lewandowski, Z.; Caldwell, D. E.; Korber, D. R.; Lappin-Scott, H. M., Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, *49*, 711-745.
148. Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D. G.; Costerton, J. W., Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* **2002**, *56*, 187-209.
149. Lasa, I.; del Pozo, J. L.; Penadés, J. R.; Leiva, J., Biofilms bacterianos e infección. *An. Sist. Sanit. Navar.* **2005**, *28* (2), 163-175.
150. Suntharalingam, P.; Cvitkovitch, D. G., Quorum sensing in streptococcal biofilm formation. *Trends Microbiol.* **2005**, *13* (1), 3-6.
151. Hall-Stoodley, L.; Costerton, J. W.; Stoodley, P., Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2* (2), 95-108.
152. Di Poto, A.; Sbarra, M. S.; Provenza, G.; Visai, L.; Speziale, P., The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biomaterials* **2009**, *30* (18), 3158-3166.
153. Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Greenberg, E. P., Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **1999**, *284* (5418), 1318-1322.
154. Nilsson, R. E.; Ross, T.; Bowman, J. P., Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *150* (1), 14-24.
155. Fux, C. A.; Costerton, J. W.; Stewart, P. S.; Stoodley, P., Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiol.* **2005**, *13* (1), 34-40.
156. Li, Y. H.; Tang, B.; Aspiras, M. B.; Lau, P. C.; Lee, J. H.; Ellen, R. P.; Cvitkovitch, D. G., A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* **2002**, *184* (10), 2699-2708.
157. Taylor, P. W.; Stapleton, P. D.; Luzio, J. P., New ways to treat bacterial infections. *Drug Discov. Today* **2002**, *7* (21), 1086-1091.
158. Nyman, E. S.; Hynninen, P. H., Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2004**, *73*, 1-28.
159. Brunsting, L. A.; Mason, H. L., Porphyrin with cutaneous manifestations. *Arch. Derm. Syphilol.* **1949**, *60* (1), 66-81.

160. Moser, J. G., Photodynamic tumor therapy: 2nd and 3rd generation photosensitizers. In *Cap. 1. General considerations* [Online] Harwood Academic: Amsterdam, 1998.
161. Milanesio, M. E.; Spesia, M. B.; Cormick, M. P.; Durantini, E. N., Mechanistic studies on the photodynamic effect induced by a dicationic fullerene C₆₀ derivative on *Escherichia coli* and *Candida albicans* cells. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2013**, *10*, 320-327.
162. Ferreyra, D. D.; Spesia, M. B.; Milanesio, M. E.; Durantini, E. N., Synthesis and photodynamic properties of 5,10,15,20-tetrakis[3-(*N*-ethyl-*N*-methylcarbazoyl)]chlorin and its analogous porphyrin in solution and in human red blood cells. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2014**, *282*, 16-24.
163. Ochoa, A. L.; Tempesti, T. C.; Spesia, M. B.; Milanesio, M. E.; Durantini, E. N., Synthesis and photodynamic properties of adamantylethoxy Zn(II) phthalocyanine derivatives in different media and in human red blood cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *50*, 280-287.
164. Wainwright, M.; Phoenix, D. A.; Marland, J.; Wareing, D. R.; Bolton, F. J., A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. *Immunol. Med. Microbiol.* **1997**, *19* (1), 75-80.
165. Maisch, T., Strategies to optimize photosensitizers for photodynamic inactivation of bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2015**, *150*, 2-10.
166. Alvarez, M. G.; Montes de Oca, M. N.; Milanesio, M. E.; Ortiz, C. S.; Durantini, E. N., Photodynamic properties and photoinactivation of *Candida albicans* mediated by brominated derivatives of triarylmethane and phenothiazinium dyes. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2014**, *11*, 148-155.
167. Minnock, A.; Vernon, D. I.; Schofield, J.; Griffiths, J.; Parish, J. H.; Brown, S. B., Mechanism of uptake of a cationic water soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 522-527.
168. Huang, L.; Krayerd, M.; Roubilb, J. G. S.; Huang, Y.-Y.; Holtene, D.; Lindsey, J. S.; Hamblin, M. R., Stable synthetic mono-substituted cationic bacteriochlorins mediate selective broad-spectrum photoinactivation of drug-resistant pathogens at nanomolar concentrations. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2014**, *141*, 119-127.

169. Huang, L.; Terakawa, M.; Zhiyentayev, T.; Huang, Y.-Y.; Sawayama, Y.; Jahnke, A.; Tegos, G. P.; Wharton, T.; Hamblin, M. R., Novel cationic fullerenes as broad spectrum light activated antimicrobials. *Nanomedicine* **2010**, *6*, 442-452.
170. Yin, R.; Wang, M.; Huang, Y. Y.; Huang, H. C.; Avci, P.; Chiang, L. Y.; Hamblin, M. R., Photodynamic therapy with decacationic[60]fullerene monoadducts: effect of a light absorbing electron-donor antenna and micellar formulation. *Nanomedicine* **2014**, *10* (4), 795-808.
171. Spesia, M. B.; Milanesio, M. E.; Durantini, E. N., Synthesis, properties and photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by novel cationic fullerene C₆₀ derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 853-861.
172. Cieplik, F.; Späth, A.; Regensburger, J.; Gollmer, A.; Tabenski, A.; Hiller, K.-A.; Bäuml, W.; Maisch, T., Photodynamic biofilm inactivation by SAPYR an exclusive singlet oxygen photosensitizer. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *65*, 477-487.
173. Maisch, T.; Eichner, A.; Späth, A.; Gollmer, A.; König, B.; Regensburger, J.; Bäuml, W., Fast and effective photodynamic inactivation of multiresistant bacteria by cationic riboflavin derivatives. *PLoS One* **2014**, *9* (12), 111792.
174. Winter, S.; Tortik, N.; Kubin, A.; Krammer, B.; Plaetzer, K., Back to the roots: photodynamic inactivation of bacteria based on water-soluble curcumin bound to polyvinylpyrrolidone as a photosensitizer. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**, *12* (10), 1795-1802.
175. Jiao, L.; Yu, C.; Liu, M.; Wu, Y.; Cong, K.; Meng, T.; Wang, Y.; Hao, E., Synthesis and functionalization of asymmetrical benzo-fused BODIPY dyes. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (17), 6035-6038.
176. Loudet, A.; Burgess, K., BODIPY dyes and their derivatives: syntheses and spectroscopic properties. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891-4932.
177. Caruso, E.; Banfi, S.; Barbieri, P.; Leva, B.; T., O. V., Synthesis and antibacterial activity of novel cationic BODIPY photosensitizers. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2012**, *114*, 44-51.
178. Solanko, L. M.; Honigsmann, A.; Midtiby, H. S.; Lund, F. W.; Brewer, J. R.; Dekaris, V.; Bittman, R.; Eggeling, C.; Wüstner, D., Membrane orientation and lateral diffusion of BODIPY-cholesterol as a function of probe structure. *Biophys J.* **2013**, *105* (9), 2082-2092.

179. Drummen, G. P.; van Liebergen, L. C.; Op den Kamp, J. A.; Post, J. A., C11-BODIPY(581/591), an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. *Free Radic Biol Med.* **2002**, *33* (4), 473-490.
180. Sharma, S. K.; Chiang, L. Y.; Hamblin, M. R., Photodynamic therapy with fullerenes *in vivo*: reality or a dream? *Nanomedicine* **2011**, *6*, 1813-1825.
181. Peng, Q.; Juzeniene, A.; Chen, J.; Svaasand, L. O.; Warloe, T.; Giercksky, K.-E.; Moan, J., Lasers in medicine. *Rep. Prog. Phys.* **2008**, *71*, 56701.
182. Hamblin, M. R., Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr. Opin. Microbiol.* **2016**, *33*, 67-73.
183. Boyle, N. M.; Rochford, J.; Pryce, M. T., Thienyl-appended porphyrins: synthesis, photophysical and electrochemical properties, and their applications. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 77-102.
184. Ogilby, P. R., Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3181-3209.
185. Milanesio, M. E.; Alvarez, M. G.; Bertolotti, S. G.; Durantini, E. N., Photophysical characterization and photodynamic activity of metallo 5-(4-(trimethylammonium)phenyl)-10,15,20-tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)porphyrin in homogeneous and biomimetic media. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 963-972.
186. Almeida, A.; Cunha, A.; Faustino, M. A. F.; Tomé, A. C.; Neves, M. G. P. M. S., Porphyrins as Antimicrobial Photosensitizing Agents. In *Comprehensive series in photochemistry and photobiology*, Hamblin, M. R.; Jori, G., Eds. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2011; Vol. 11.
187. Hunter, C. A.; Sanders, J. K. M., The nature of π - π interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5525-5534.
188. Kobayashi, T., J-Aggregates. World Scientific: Singapore, 2012.
189. Ohno, O.; Kaizu, Y.; Kobayashi, H., J-aggregate formation of a water-soluble porphyrin in acidic aqueous media. *J. Chem. Phys.* **1993**, *99* (5), 4128-4139.

190. Akhtar, N.; Khan, R. A., Liposomal systems as viable drug delivery technology for skin cancer sites with an outlook on lipid-based delivery vehicles and diagnostic imaging inputs for skin conditions. *Prog. Lipid Res.* **2016**, *64*, 192-230.
191. Vimaladevi, M.; Chellapathi Divya, K. C.; Girigoswami, A., Liposomal nanoformulations of rhodamine for targeted photodynamic inactivation of multidrug resistant gram negative bacteria in sewage treatment plant. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2016**, *162*, 146-152.
192. Villa, C. H.; Anselmo, A. C.; Mitragotri, S.; Muzykantov, V., Red blood cells: Supercarriers for drugs, biologicals, and nanoparticles and inspiration for advanced delivery systems. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2016**, *106*, 88-103.
193. Mora, S. J.; Milanesio, M. E.; Durantini, E. N., Spectroscopic and photodynamic properties of 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N*-dimethylaminopropoxy)phenyl]porphyrin and its tetracationic derivative in different media. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2013**, *270*, 75-84.
194. Hanakova, A.; Bogdanova, K.; Tomankova, K.; Pizova, K.; Malohlava, J.; Binder, S.; Bajgar, R.; Langova, K.; Kolar, M.; Mosinger, J.; Kolarova, H., The application of antimicrobial photodynamic therapy on *S. aureus* and *E. coli* using porphyrin photosensitizers bound to cyclodextrin. *Microbiol. Res.* **2014**, *169*, 163-170.
195. Langa, K.; Mosinger, J.; Wagnerová, D. M., Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy. *Coord. Chem. Rev.* **2004**, *248*, 321-350.
196. Lim, M. E.; Lee, Y.; Zhang, Y.; Chu, J. J. H., Photodynamic inactivation of viruses using upconversion nanoparticles. *Biomaterials* **2012**, *33*, 1912-1920.
197. Agazzi, M. L.; Spesia, M. B.; Gsponer, N. S.; Milanesio, M. E.; Durantini, E. N., Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of a fulleropyrrolidine bearing a basic amino group and its dicationic analog against *Staphylococcus aureus*. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2015**, *310*, 171-179.
198. Caminos, D. A.; Spesia, M. B.; Durantini, E. N., Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by novel meso-substituted porphyrins by 4-(3-*N,N,N*-trimethylammoniumpropoxy)phenyl and 4-(trifluoromethyl)phenyl groups. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2006**, *5*, 56-65.

199. Ferreyra, D. D.; Reynoso, E.; Cordero, P.; Spesia, M. B.; Alvarez, M. G.; Milanesio, M. E.; Durantini, E. N., Synthesis and properties of 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N*-dimethylaminopropoxy)phenyl]chlorin as potential broad spectrum antimicrobial photosensitizers. *J. Photochem. Photobio. B: Biol.* **2016**, *158*, 243-251.
200. Kim, J.; Santos, O. A.; Park, J. H., Selective photosensitizer delivery into plasma membrane for effective photodynamic therapy. *J. Control Release.* **2014**, *191*, 98-104.
201. Caminos, D. A.; Spesia, M. B.; Pons, P.; Durantini, E. N., Mechanisms of *Escherichia coli* photodynamic inactivation by an amphiphilic tricationic porphyrin and 5,10,15,20-tetra(4-*N,N,N*-trimethylammoniumphenyl)porphyrin. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 1071-1078.
202. Spesia, M. B.; Caminos, D. A.; Pons, P.; Durantini, E. N., Mechanistic insight of the photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by a tetracationic zinc(II) phthalocyanine derivative. *Photodiag. Photodyn. Ther.* **2009**, *6* (1), 52-61.
203. Cormick, M. P.; Quiroga, E. D.; Bertolotti, S. G.; Alvarez, M. G.; Durantini, E. N., Mechanistic insight of the photodynamic effect induced by tri- and tetra-cationic porphyrins on *Candida albicans* cells. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 1556-1561.
204. Quiroga, E. D.; Cormick, M. P.; Pons, P.; Alvarez, M. G.; Durantini, E. N., Mechanistic aspects of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* induced by cationic porphyrin derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *58*, 332-339.
205. Gollmer, A.; Felgentraeger, A.; Maisch, T.; Flors, C., Real-time imaging of photodynamic action in bacteria. *J. Biophotonics* **2016**, *10* (2), 264-270.
206. Li, K.; Lei, W.; Jiang, G.; Hou, Y. Z., B.; Zhou, Q.; Wang, X., Selective photodynamic inactivation of bacterial cells over mammalian cells by new triarylmethanes. *Langmuir* **2014**, *30* (48), 14573-14580.
207. Sharma, S. K.; Dai, T.; Kharkwal, G. B.; Huang, Y.-Y.; Huang, L.; Bil De Arce, V. J.; Tegos, G. P.; Hamblin, M. R., Drug discovery of antimicrobial photosensitizers using animal models. *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 1303-1319.
208. Simões, C.; Gomes, M. C.; Neves, M. G. P. M. S.; Cunha, Â.; Tomé, J. P. C.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Almeida, A.; Faustino, M. A. F., Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* with cationic meso-tetraarylporphyrins – The charge number and charge distribution effects. *Catal. Today* **2016**, *266*, 197-204.

209. Hamblin, M. R.; O'Donnell, D. A.; Murthy, N.; Rajagopalan, K.; Michaud, N.; Sherwood, M. E.; Hasan, T., Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, *49*, 941-951.
210. Tegos, G. P.; Anbe, M.; Yang, C.; Demidova, T. N.; Satti, M.; Mroz, P.; Janjua, S.; Gad, F.; Hamblin, M. R., Protease stable polycationic photosensitizer conjugates between polyethyleneimine and chlorin(e6) for broad spectrum antimicrobial photoinactivation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 1402-1410.
211. Bombelli, C.; Bordi, F.; Ferro, S.; Giansanti, L.; Jori, G.; Mancini, G.; Mazzuca, C.; Monti, D.; Ricchelli, F.; Sennato, S.; Venanzi, M., New cationic liposomes as vehicles of m-tetrahydroxyphenylchlorin in photodynamic therapy of infectious diseases. *Mol. Pharm.* **2008**, *5*, 672-679.
212. Perni, S.; Piccirillo, C.; Pratten, J.; Prokopovich, P.; Chrzanowski, W.; Parkin, I. P.; Wilson, M., The antimicrobial properties of light-activated polymers containing methylene blue and gold nanoparticles. *Biomaterials* **2009**, *30*, 89-93.
213. Gualdesi, M. S.; Alvarez Igarzabal, C. I.; Vara, J.; Ortiz, C. S., Synthesis and physicochemical properties of polyacrylamide nanoparticles as photosensitizer carriers. *Int. J. Pharm.* **2016**, *512* (1), 213-218.
214. Rout, B.; Liu, C.-H.; Wu, W.-C., Enhancement of photodynamic inactivation against *Pseudomonas aeruginosa* by a nano-carrier approach. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2016**, *140*, 472-480.
215. Sobczyński, J.; Polski, A., Nanocarriers for photosensitizers for use in antimicrobial photodynamic therapy. In *Nanostructures for antimicrobial therapy. A volume in micro and nano technologies 2017*, Elsevier Inc.: 2017; pp 481-502.
216. Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R., The porphyrin handbook. In *Synthesis and Organic Chemistry* [Online] Press, A., Ed. Florida, E.E.U.U., 2000.
217. Luzgina, V. N.; Filippovich, E. I.; Evstigneeva, R. P., Hematoporphyrin IX. *Pharm. Chem. J.* **1977**, *11* (5), 613-620.
218. Scandola, F.; Chiorboli, C.; Prodi, A.; Lengo, E.; Alessio, E., Photophysical properties of metal-mediated assemblies of porphyrins. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250* (11-12), 1471-1496.

219. Alenezi, K.; Tovmasyan, A.; Batinic-Haberle, I.; Benov, L. T., Optimizing Zn porphyrin-based photosensitizers for efficient antibacterial photodynamic therapy. *Photodiag. Photodyn. Ther.* **2017**, *17*, 154-159.
220. Bonnett, R.; Martínez, G., Photobleaching of sensitisers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron* **2001**, *57* (47), 9513-9547.
221. Rotomskis, R.; Bagdonas, S.; Streckyte, G., Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of porphyrins used in tumour therapy. *J. Photochem. Photobiol. B.* **1996**, *33* (1), 61-67.
222. Zaidi, S. H. H.; Fico, R. M.; Lindsey, J. S., Investigation of streamlined syntheses of porphyrins bearing distinct meso substituents. *Org. Process Res. Dev.* **2006**, *10*, 118-134.
223. Kooriyaden, F. R.; Sujatha, S.; Arunkumar, C., Study of scrambling in porphyrin forming reactions: synthesis, structure, photophysical, electrochemical and antimicrobial studies. *Polyhedron* **2017**, *128*, 85-94.
224. Geier, G. R.; Littler, B. J.; Lindsey, J. S., Investigation of porphyrin forming reactions. Part 3. The origin of scrambling in dipyrromethane + aldehyde condensations yielding trans-A₂B₂-tetraarylporphyrins. *Chem. Soc. Perkin Trans.* **2001**, *2*, 701-711.
225. Rothermund, P., Porphyrin studies. III. The structure of the porphine ring system. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, *61*, 2912-2915.
226. Rothermund, P., Formation of porphyrins from pyrrole and aldehydes. *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, *57*, 2010-2011.
227. Rothermund, P.; Menotti, A. R., Porphyrin studies. IV.1 The synthesis of $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -tetraphenylporphine. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *58*, 625-270.
228. Alder, A. D.; Longo, F. R.; Finarelli, F. C.; Assour, J.; Korsakoff, L., A simplified synthesis for meso-tetraphenylporphine. *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 476-477.
229. Lindsey, J. S.; Schreiman, Y. C.; Hsu, H. C.; Kearney, P. C.; Marguerettaz, A. M., Rothermund and Adler Longo reactions revisited: synthesis of tetraphenylporphyrins under equilibrium conditions. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 827-836.
230. Durantini, E.; Silber, J. J., Synthesis of 5-(4-acetamidophenyl)-10,15,20-tris(4-substituted phenyl) porphyrins using dipyrromethanes. *Synth. Commun.* **1999**, *29* (19), 3353-3368.

231. Gust, D.; Moore, T. A.; Moore, A. L.; Liddel, P. A., Synthesis of carotenoporphyrin models for photosynthetic energy and electron transfer. *Methods Enzymol.* **1992**, *213*, 87-100.
232. Arsenault, G. P.; Bullock, E.; M., M. S., Pyrromethanes and porphyrins therefrom. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4384-4389.
233. Smith, K. M., Porphyrin. In *Comprehensive coordination chemistry II*, Ltd., E., Ed. Louisiana State University: Baton Rouge, LA, USA, 2003; Vol. 1, pp 493-506.
234. Littler, B. J.; Miller, M. A.; Hung, C.-H.; Wagner, R. W.; O'Shea, D. F.; Boyle, P. D.; Lindsey, J. S., Refined synthesis of 5-substituted dipyrromethanes. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1391-1396.
235. Gryko, D.; Lindsey, J. S., Rational synthesis of meso-substituted porphyrins bearing one nitrogen heterocyclic group. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (7), 2249-2252.
236. Caminos, D. A.; Durantini, E. N., Synthesis of asymmetrically mesosubstituted porphyrins bearing amino groups as potential cationic photodynamic agents. *J. Porphyr. Phthalocya.* **2005**, *9*, 334-342.
237. Lee, C. H.; Lindsey, J. S., One-flask synthesis of meso-substituted dipyrromethanes and their application in the synthesis of trans-substituted porphyrin building blocks. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 11427-11440.
238. Rao, P. D.; Dhanalekshmi, S.; Littler, B. J.; Lindsey, J. S., Rational synthesis of porphyrins bearing up to two different meso substituents. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7323-7344.
239. Wallace, D. M.; Leung, S. H.; Senge, M. O.; Smith, K. M., Rational tetraarylporphyrin syntheses: tetraarylporphyrins from the MacDonald route. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 7245-7257.
240. Wallace, D. M.; Smith, K. M., Stepwise syntheses of unsymmetrical tetraarylporphyrins. Adaptation of the MacDonald dipyrrole self-condensation methodology. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31* (50), 7265-7268.
241. Lee, C. H.; Li, F.; Iwamoto, K.; Dadok, J.; Bothner, B. A. A.; Lindsey, J. S., Synthetic approaches to regioisomerically pure porphyrins bearing four different meso-substituents. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 11645-11672.

242. Milanesio, M. E.; Durantini, E. N., Synthesis and spectroscopic properties of a covalently linked porphyrin–fullerene C₆₀ dyad. *Synth. Commun.* **2006**, *36*, 2135-2144.
243. Milanesio, M. E.; Alvarez, M. G.; Yslas, E. I.; Borsarelli, C. D.; Silber, J. J.; Rivarola, V.; Durantini, E. N., Photodynamic studies of metallo 5,10,15,20-tetrakis(4-methoxyphenyl) porphyrin: photochemical characterization and biological consequences in a human carcinoma cell line. *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74* (1), 14-21.
244. Boyle, R. W.; Dolphin, D., Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. *Photochem. Photobiol.* **1996**, *64*, 469-485.
245. Ruzié, C.; Michaudet, L.; Boitrel, B., Synthesis of a new bis-pyridyl crown-capped porphyrin. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7423-7426.
246. Milanesio, M. E.; Gervaldo, M.; Otero, L. A.; Sereno, L.; Silber, J. J.; Durantini, E. N., Synthesis of a diporphyrin dyad bearing electron-donor and electron-withdrawing substituents with potential use in the spectral sensitization of semiconductor solar cells. *J. Porphyr. Phthalocya.* **2003**, *7*, 42-51.
247. Scalise, I.; Durantini, E. N., Photodynamic effect of metallo 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-tris(4-methylphenyl) porphyrins in biomimetic AOT reverse micelles containing urease. *J. Photochem. Photobio. A: Chem.* **2004**, *162*, 105-113.
248. Barbosa Neto, N. M.; Correa, D. S.; De Boni, L.; Parra, G. G.; Misoguti, L.; Mendonça, C. R.; Borissevitch, I. E.; Zilioc, S. C.; Gonçalves, P. J., Excited states absorption spectra of porphyrins – Solvent effects. *Chem. Phys. Lett.* **2013**, *587*, 118-123.
249. Kooriyaden, F. R.; Sujatha, S.; Arunkumar, C., Synthesis, spectral, structural and antimicrobial studies of fluorinated porphyrins. *Polyhedron* **2015**, *97*, 66-74.
250. Cormick, M. P.; Alvarez, M. G.; Rovera, M.; Durantini, E. N., Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 1592-1599.
251. DeRosa, M. C.; Crutchley, R. J., *Coordination Chemistry Reviews*. 2002; Vol. 233–234, p 351-371.
252. Gottfried, V.; Peled, D.; Winkelman, J. W.; Kimel, S., Photosensitizers in organized media: singlet oxygen production and spectral properties. *Photochem. Photobiol.* **1988**, *48*, 157–163.

253. Kroto, H. W.; Heath, J. R.; O'Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E., C₆₀: buckminsterfullerene. *Nature* **1985**, *318*, 162-163.
254. Krätschmer, W.; Lamb, L. D.; Fostiropoulos, K.; Huffman, D. R., Solid C₆₀: a new form of carbon. *Nature* **1990**, *347* (354-358).
255. Diederich, F.; Isaacs, L.; Philp, D., Syntheses, structures, and properties of methanofullerenes. *Chem. Soc. Rev.* **1994**, *23*, 243-255.
256. Li, F. B.; Wang, G. W., Fullerenes. In *Kirk-othmer encyclopedia of chemical technology* [Online] 2013.
257. Prato, M.; Maggini, M., Fulleropyrrolidines: a family of full-fledged fullerene derivatives. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 519-526.
258. Cataldo, F.; Da Ros, T., *Medicinal chemistry and pharmacological potential of fullerenes and carbon nanotubes*. 2008; Vol. 1.
259. Hotze, E. M.; Labille, J.; Alvarez, P.; Wiesner, M. R., Mechanisms of photochemistry and reactive oxygen production by fullerene suspensions in water. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 4175-4180.
260. Hou, W.-C.; Huang, S.-H., Photochemical reactivity of aqueous fullerene clusters: C₆₀ versus C₇₀. *J. Hazard. Mater.* **2017**, *322*, 310-317.
261. Chiang, L. Y.; Wang, L.-Y.; Swirczewski, J. W.; Soled, S.; Cameron, S., Efficient synthesis of polyhydroxylated fullerene derivatives via hydrolysis of polycyclosulfated precursors. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3960-3968.
262. Da Ros, T.; Prato, M.; Novello, F.; Maggini, M.; Banfi, E., Easy access to water-soluble fullerene derivatives via 1,3-dipolar cycloadditions of azomethine ylides to C₆₀. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9070-9072.
263. Brettreich, M.; Hirsch, A., A highly water soluble dendro[60]fullerene. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2731-2734.
264. Katz, E. A., Fullerene thin films as photovoltaic material. In *Nanostructured Materials for Solar Energy Conversion*, Soga, T., Ed. Elsevier B. V.: 2006.
265. Otero, G.; Biddau, G.; Sánchez-Sánchez, C.; Caillard, R.; López, M. F.; Rogero, C.; Palomares, F. J.; Cabello, N.; Basanta, M. A.; Ortega, J.; Méndez, J.; Echavarren, A. M.;

Pérez, R.; Gómez-Lor, B.; Martín-Gago, J. A., Fullerenes from aromatic precursors by surface-catalysed cyclodehydrogenation. *Nature* **2008**, *454* (14), 865-869.

266. Gómez-Lor, B.; Echavarren, A. M., Synthesis of a triaza analogue of crushed-fullerene by intramolecular palladium-catalyzed arylation. *Org. Lett.* **2004**, *6* (17), 2993-2996.

267. Hirsch, A., The chemistry of the fullerenes. Verlag, G. T., Ed. Stuttgart, Germany, 1994.

268. Wudl, F., The chemical properties of buckminsterfullerene (C_{60}) and the birth and infancy of fulleroids. *Acc. Chem. Res.* **1992**, *25*, 157-161.

269. Maggini, M.; Scorrano, G.; Prato, M., Addition of azomethine ylides to C_{60} : synthesis, characterization, and functionalization of fullerene pyrrolidines. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9798-9799.

270. Wilson, S. R.; Lu, Q., 1,3-dipolar cycloaddition of *N*-methylazomethine ylide to C_{70} . *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6496-6498.

271. Mroz, P.; Pawlak, A.; Satti, M.; Lee, H.; Wharton, T.; Gali, H.; Sarna, T.; Hamblin, M. R., Functionalized fullerenes mediate photodynamic killing of cancer cells: type I *versus* type II photochemical mechanism. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *43*, 711-719.

272. Tegos, G. P.; Demidova, T. N.; Arcila-Lopez, D.; Lee, H.; Wharton, T.; Gali, H.; Hamblin, M. R., Cationic fullerenes are effective and selective antimicrobial photosensitizers. *Chem. Biol.* **2005**, *12* (10), 1127-1135.

273. Singh, M. S.; Chowdhury, S.; Koley, S., Progress in 1,3-dipolar cycloadditions in the recent decade: an update to strategic development towards the arsenal of organic synthesis. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 1603-1644.

274. Gsponer, N. S.; Agazzi, M. L.; Spesia, M. B.; Durantini, E. N., Approaches to unravel pathways of reactive oxygen species in the photoinactivation of bacteria induced by a dicationic fulleropyrrolidinium derivative. *Methods* **2016**, *109*, 167-174.

275. Guldi, D. M.; Prato, M., Excited-state properties of C_{60} fullerene derivatives. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 695-703.

276. Leach, S.; Vervloet, M.; Desprks, A.; BrCheret, E.; Hare, J. P.; Dennis, T. J.; Kroto, H. W.; Taylor, R.; Walton, D. R. M., Electronic spectra and transitions of the fullerene C₆₀. *Chem. Phys.* **1992**, *160*, 451-466.
277. Guldi, D. M.; Asmus, K. D., Photophysical properties of mono- and multiply-functionalized fullerene derivatives. *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 1472-1481.
278. Zhang, Y.; Dai, T.; Wang, M.; Vecchio, D.; Chiang, L. Y.; Hamblin, M. R., Potentiation of antimicrobial photodynamic inactivation mediated by a cationic fullerene by added iodide: *in vitro* and *in vivo* studies. *Nanomedicine* **2015**, *10*, 603-614.
279. Allison, R. R.; Downie, G. H.; Cuenca, R.; Hu, X.-H.; Childs, C. J.; Sibata, C. H., Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2004**, *1*, 27-42.
280. Boyd, P. D. W.; Reed, C. A., Fullerene porphyrin constructs. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *38*, 235-242.
281. Schuster, D. I.; Cheng, P.; Jarowski, P. D.; Guldi, D. M.; Luo, C.; Echegoyen, L.; Pyo, S.; Holzwarth, A. R.; Braslavsky, S. E.; Williams, R. M.; Klihm, G., Design, synthesis, and photophysical studies of a porphyrin-fullerene dyad with parachute topology; charge recombination in the Marcus inverted region. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7257-7270.
282. Chiang, L. Y.; Padmawar, P. A.; Rogers-Haley, J.-E.; So, G.; Canteenwala, T.; Thota, S., Synthesis and characterization of highly photoresponsive fullereryl dyads with a close chromophore antenna-C(60) contact and effective photodynamic potential. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 5280-5293.
283. Tuchin, V. V.; Wang, R. K.; Yeh, A. T., Optical clearing of tissues and cells *J. Biomed. Opt.* **2008**, *13* (2), 021101.
284. Jiang, J.; Boese, M.; Turner, P.; Wang, R. K., Penetration kinetics of dimethyl sulphoxide and glycerol in dynamic optical clearing of porcine skin tissue *in vitro* studied by Fourier transform infrared spectroscopic imaging. *J. Biomed. Opt.* **2008**, *13*, 21105-21107.
285. Sun, Y. P.; Wang, P.; Hamilton, N. B., Fluorescence spectra and quantum yields of buckminsterfullerene (C₆₀) in room-temperature solutions. No excitation wavelength dependence. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6378-6381.

286. Guldi, D. M.; Maggini, M.; Scorrano, G.; Prato, M., Intramolecular electron transfer in fullerene/ferrocene based donor-bridge-acceptor dyads. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 974-980.
287. Eckert, J. F.; Nicoud, J. F.; Nierengarten, J. F.; Liu, S. G.; Echegoyen, L.; Barigelletti, F.; Armaroli, N.; Ouali, L.; Krasnikov, V.; Hadziioannou, G., Fullerene-oligophenylenevinylene hybrids: synthesis, electronic properties, and incorporation in photovoltaic devices. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7467-7479.
288. Ebbesen, T. W.; Tanigaki, K.; Kuroshima, S., Excited-state properties of C₆₀. *Chem. Phys. Lett.* **1991**, *181* (6), 501-504.
289. Arbogast, J. W.; Darmanyan, A. P.; Foote, C. S.; Diederich, F. N.; Whetten, R. L.; Rubin, Y.; Alvarez, M. M.; Anz, S. J., Photophysical properties of sixty atom carbon molecule (C₆₀). *J. Phys. Chem. A* **1991**, *95*, 11-12.
290. Thomas, K. G.; Biju, V.; George, M. V.; Guldi, D. M.; Kamat, P. V., Excited-state interactions in pyrrolidinofullerenes. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 5341-5348.
291. Yamakoshi, Y.; Sueyoshi, S.; Fukuhara, K.; Miyata, N.; Masumizu, T.; Kohno, M., [•]OH and O₂^{•-} generation in aqueous C₆₀ and C₇₀ solutions by photoirradiation: An EPR study. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12363-12364.
292. Hamano, T.; Okuda, K.; Mashino, T.; Hirobe, M.; Arakane, K.; Ryu, A.; Mashiko, S.; Nagano, T., Singlet oxygen production from fullerene derivatives: effect of sequential functionalization of the fullerene core. *Chem. Commun.* **1997**, *1*, 21-22.
293. Hung, R. R.; Grabowski, J. J., A precise determination of the triplet energy of carbon (C₆₀) by photoacoustic calorimetry. *J. Phys. Chem. A* **1991**, *95*, 6073-6075.
294. Yamakoshi, Y.; Umezawa, N.; Ryu, A.; Arakane, K.; Miyata, N.; Goda, Y.; Masumizu, T.; Nagano, T., Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C₆₀) as potential medicines: O₂^{•-} versus ¹O₂. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12803-12809.
295. Almeida, R. D.; Manadas, B. J.; Carvalho, A. P.; Duarte, C. B., Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1704*, 59-86.
296. Markovic, Z.; Trajkovic, V., Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C₆₀). *Biomaterials* **2008**, *29*, 3561-3573.

297. Issa, Z.; Hamblin, M. R., Photodynamic therapy of infectious disease mediated by functionalized fullerenes. In *Nanotechnology in diagnosis, treatment and prophylaxis of infectious diseases*, Kon, M. R. a. K., Ed. Elsevier Science & Technology Books: 2015.
298. Koeppe, R.; Sariciftci, N. S., Photoinduced charge and energy transfer involving fullerene derivatives. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2006**, *5*, 1122-1131.
299. Arbogast, J. W.; Foote, C. S.; Kao, M., Electron transfer to triplet fullerene C₆₀. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2277-2279.
300. Schuster, D. I., Synthesis and photophysics of new types of fullerene-porphyrin dyads. *Carbon* **2000**, *38*, 1607-1614.
301. Milanesio, M. E.; Gervaldo, M.; Otero, L.; Sereno, L.; Silber, J. J.; Durantini, E., Synthesis and photophysical properties of Zn(II) porphyrin-C₆₀ dyad with potencial use in solar cells. *J. Phys. Org. Chem.* **2002**, *15*, 844-851.
302. Fungo, F.; Otero, L.; Borsarelli, C. D.; Durantini, E. N.; Silber, J. J.; Sereno, L., Photocurrent generation in thin SnO₂ nanocrystalline semiconductor film electrodes from photoinduced charge-separation state in porphyrin-C₆₀ dyad. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 4070-4078.
303. Imahori, H.; El-Khouly, M. E.; Fujitsuka, M.; Ito, O.; Sakata, Y.; Fukuzumi, S. J., Solvent dependence of charge separation and charge recombination rates in porphyrin-fullerene dyad. *Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 325-332.
304. Milanesio, M. E.; Alvarez, M. G.; Rivarola, V.; Silber, J. J.; Durantini, E. N., Porphyrin-fullerene C₆₀ dyads with high ability to form photoinduced charge-separated state as novel sensitizers for photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 891-897.
305. Alvarez, M. G.; Prucca, C.; Milanesio, M. E.; Durantini, E. N.; Rivarola, V., Photodynamic activity of a new sensitizer derived from porphyrin-C₆₀ dyad and its biological consequences in a human carcinoma cell line. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2006**, *38*, 2092-2101.
306. Detty, M. R.; Gibson, S. T.; Wagner, S. J., Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3897-3915.
307. Oniszczyk, A.; Wojtunik-Kulesza, K. A.; Oniszczyk, T.; Kasprzak, K., The potential of photodynamic therapy (PDT)-experimental investigations and clinical use. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *83*, 912-929.

308. Brown, S., Clinical trial to investigate treatment with photodynamic therapy to reduce levels of bacteria in leg ulcers. 2012; p www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00825760.
309. Bu, W.; Xu, X.; Wang, Y.; Huang, L.; Zeng, R.; Chen, X.; Fang, F., Surgery combined with photodynamic therapy for the treatment of Hidradenitis Suppurativa: a report of 7 cases. *Photodiag. Photodyn. Ther.* **2017**, *18*, 46-49.
310. Wilson, M., Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 412-418.
311. Borczyk, D.; Piatowska, D.; Kizeminski, Z., An *in vitro* study of affected as a risk factor for the development of secondary caries. *Caries Res.* **2006**, *40*, 47-51.
312. Araújo, P. V.; Correia-Silva, J. F.; Gomez, R. G.; Andrade Massara, M. L.; Cortes, M. E.; Abreu Poletto, L. T., Antimicrobial effect of photodynamic therapy in carious lesions in vivo, using culture and real-time PCR methods. *Photodiag. Photodyn. Ther.* **2015**, *12*, 401-407.
313. Santezi, C.; Tanomarua, J. M. G.; Bagnato, V. S.; Oliveira, O. V.; Dovigoa, L. N., Potential of curcumin-mediated photodynamic inactivation to reduce oral colonization. *Photodiag. Photodyn. Ther.* **2016**, *15*, 46-52.
314. Nagata, J. Y.; Noboru Hioka, N.; Kimurac, E.; Batistela, V. R.; Terada, R. S. S.; Graciano, A. X.; Baesso, M. L.; Hayacibar, M. F., Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. *Photodiag. Photodyn. Ther.* **2012**, *9*, 122-131.
315. Lima, J. P. M.; Sampaio de Melo, M. A.; Borges, F. M. C.; Teixeira, A. H.; Steiner-Oliveira, C.; Nobre dos Santos, M.; Rodrigues, L. K. A.; Zanin, I. C. J., Evaluation of the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy in an *in situ* model of dentine caries. *Eur. J. Oral Sci.* **2009**, *117*, 568-574.
316. Mombelli, A., Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. *Periodontol. 2000* **2002**, *28*, 177-189.
317. Tavares, L. J.; Pavarina, A. C.; Vergani, C. E.; Avila, E. D., The impact of antimicrobial photodynamic therapy on peri-implant disease: What mechanisms are involved in this novel treatment? *Photodiag. Photodyn. Ther.* **2017**, *17*, 236-244.

318. Scherer, P.; Neugebauer, J.; Karapetian, V. E.; Zöller, J. E., Initial therapy of peri-implantitis by antimicrobial photodynamic therapy. In *The Association of Dental Implantology UK 20^a congress*, Birmingham, 2007.
319. Karapetian, V. E.; Neugebauer, J.; Clausnitzer, C. E.; E., Z. J., Comparison of different periimplantitis treatment methods. In *19th annual meeting of the academy of osseointegration*, osseointegration, B. t. f. w. i. a. o., Ed. San Francisco, USA, 2004.
320. Dörtbudak, O.; Haas, R.; Bernhart, T.; Mailath-Pokorny, G., Lethal photosensitization for decontamination of implant surfaces in the treatment of periimplantitis. *Clin. Oral. Implants. Res.* **2001**, *12* (2), 104-108.
321. Al Amri, M. D.; Kellesarian, S. V.; Ahmed, A.; Al-Kheraif, A. A.; Romanos, G. E.; Javed, F., Efficacy of periimplant mechanical debridement with and without adjunct antimicrobial photodynamic therapy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Photodiag. Photodyn. Ther.* **2016**, *14*, 166–169.
322. Abduljabbar, T.; Al-Askar, M.; Baig, M. K.; Al Sowaygh, Z. H.; Kellesarian, S. V.; Vohra, F., Efficacy of photodynamic therapy in the inactivation of oral fungal colonization among cigarette smokers and non-smokers with denture stomatitis. *Photodiag. Photodyn. Ther.* **2017**, *18*, 50-53.
323. Hsia, C. C.; Sun, T. T.; Wang, Y. Y.; Anderson, L. M.; Armstrong, D.; A., G. R., Enhancement of formation of the esophageal carcinogen benzylnitrosamine from its precursors by *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 1878-1881.
324. Ribeiro, M. C.; Caixeta, A. C.; Lara de Carli, M.; Sperandio, F. F.; Magalhães, E. M. S.; Pereira, A. A. C.; Hanemann, J. A. C., Photodynamic inactivation of oral paracoccidioidomycosis affecting woman with systemic lupus erythematosus: an unusual case report. *Photodiag. Photodyn. Ther.* **2017**, *17*, 160-163.
325. Jemli, M.; Alouini, Z.; Sabbahi, S.; Gueddari, M., Destruction of fecal bacteria in wastewater by three photosensitizers. *J. Environ. Monit.* **2002**, *4*, 511-516.
326. Lazzeri, D.; Rovera, M.; Pascua, L.; Durantini, E. N., Photodynamic studies and photoinactivation of *Escherichia coli* using meso-substituted cationic porphyrin derivatives with asymmetric charge distribution. *Photochem. Photobiol.* **2004**, *80*, 286-293.
327. Brown, S., Clinical antimicrobial photodynamic therapy: phase II studies in chronic wounds. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **2012**, *10*, 80-83.

328. Costa, L.; Alves, E.; Carvalho, C. M. B.; Tomé, J. P. C.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, A.; Almeida, A., Sewage bacteriophage photoinactivation by cationic porphyrins: a study of charge effect. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 415-422.
329. Alves, E.; Costa, L.; Carvalho, C. M. B.; Tomé, J. P. C.; Faustino, M. A.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, Â.; Almeida, A., Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. *BMC Microbiol.* **2009**, *9*, 70-83.
330. Bonnett, R.; Krysteva, M. A.; Lalov, I. G.; Artarsky, S. V., Water disinfection using photosensitizers immobilized on chitosan. *Water Res.* **2006**, *40*, 1269-1275.
331. Carvalho, C. M. B.; Gomes, A. T. P.; Fernandes, S. C. D.; Prata, A. C. B.; Almeida, M. A.; Cunha, M. A.; Tomé, J. P. C.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Lin, Z.; Rainho, J. P.; Rocha, J., Photoinactivation of bacteria in wastewater by porphyrins: bacterial beta-galactosidase activity and leucine-uptake as methods to monitor the process. *J. Photochem. Photobiol. B* **2007**, *88*, 112-118.
332. Carvalho, C. M. B.; Alves, E.; Costa, L.; Tomé, J. P. C.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Almeida, A.; Cunha, Á.; Lin, Z.; Rocha, J., Functional cationic nanomagnet porphyrin hybrids for the photoinactivation of microorganisms. *ACS Nano.* **2010**, *4*, 7133-7140.
333. Kasermann, F.; Kempf, C., Buckminsterfullerene and photodynamic inactivation of viruses. *Rev. Med Virol.* **1998**, *8*, 143-151.
334. Matsumoto, J.; Shinbara, T.; Tanimura, S.; Matsumoto, T.; Shiragami, T.; Yokoi, H.; Nosaka, Y.; Okazaki, S.; Hirakawa, K.; Yasuda, M., Water-soluble phosphorus porphyrins with high activity for visible light-assisted inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2011**, *218*, 178-184.
335. Mantareva, V.; Angelov, I.; Kussovski, V.; Dimitrov, R.; Lapok, L.; Wöhrle, D., Photodynamic efficacy of water-soluble Si(IV) and Ge(IV) phthalocyanines towards *Candida albicans* planktonic and biofilm cultures. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4430-4440.
336. Malara, D.; Hoj, L.; Heimann, K.; Citarrella, G.; Oelgemöller, M., Capacity of cationic and anionic porphyrins to inactivate the potential aquaculture pathogen *Vibrio campbellii*. *Aquaculture* **2017**, *473*, 228-236.

337. Wang, Y.; Liu, Y.; Li, G.; Hao, J., Porphyrin-based honeycomb films and their antibacterial activity. *Langmuir* **2014**, *30*, 6419-6426.
338. Funes, M. D.; Caminos, D. A.; Alvarez, M. G.; Fungo, F.; Otero, L. A.; Durantini, E. N., Photodynamic properties and photoantimicrobial action of electrochemically generated porphyrin polymeric films. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 902-908.
339. Aluigi, A.; Sotgiu, G.; Torreggiani, A.; Guerrini, A.; Orlandi, V. T.; Corticelli, F.; Varchi, G., Methylene blue doped films of wool keratin with antimicrobial photodynamic activity. *Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (31), 17416-17424.
340. Muller, M.; Bouguelia, S.; Goy, R. A.; Yoris, A.; Berlin, J.; Meche, P.; Rocher, V.; Mertens, S.; Dudal, Y., International cross validation of a BOD₅ surrogate. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2014**, *21* (23), 13642-13645.
341. Sawyer, C. N.; McCarty, P. L.; Parkin, G. F., *Chemistry for environmental engineering and science*. New York, 2003; Vol. 5th ed.
342. Prat, F.; Foote, C. S., A resin-bound photosensitizer for aqueous photooxidations. *Photochem. Photobiol.* **1998**, *67* (6), 626-627.
343. Zhao, F.; Chen, S.; Hu, Q.; Xue, G.; Ni, Q.; Jianga, Q.; Qiu, Y., Antimicrobial three dimensional woven filters containing silver nanoparticle doped nanofibers in a membrane bioreactor for wastewater treatment. *Sep. Purif. Technol.* **2017**, *175*, 130-139.
344. Heydarifard, S.; Pan, Y.; Xiao, H.; Nazha, M. M.; Shipin, O., Water-resistant cellulosic filter containing non-leaching antimicrobial starch for water purification and disinfection. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *163*, 146-152.
345. Fernández, J. G.; Almeida, C. A.; Fernández-Baldo, M. A.; Felici, E.; Raba, J.; Sanz, M. I., Development of nitrocellulose membrane filters impregnated with different biosynthesized silver nanoparticles applied to water purification. *Talanta* **2016**, *146*, 237-243.
346. Alves, E.; Carvalho, C.; Tomé, J. P. C.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Tome, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, A.; Almeida, A., Photodynamic antimicrobial chemotherapy in aquaculture: photoinactivation studies of *Vibrio fischeri*. *PLoS One* **2011**, *6*, e20970.
347. Alouini, Z.; Jemli, M., Destruction of helminth eggs by photosensitized porphyrin. *J. Environ. Monit.* **2001**, *3*, 548-551.

348. Arrojado, C. Evaluation of antimicrobial photodynamic therapy by porphyrins to inactivate fish pathogenic bacteria in aquaculture system. University of Aveiro, Portugal, 2009.
349. Baker, K. S.; Smith, R. C., *The role of solar radiation in marine ecosystems*. Plenum Press: New York, 1982.
350. Nitzan, Y.; Ashkenazi, H., Photoinactivation of *acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli* B by a cationic hydrophilic porphyrin at various light wavelengths. *Current Microbiol.* **2001**, 42, 408-414.
351. Menezes, H. D.; Pereira, A. C.; Brancini, G. T. P.; Leão, H. C.; Júnior, N. S. M.; Bachmann, L.; Wainwright, M.; Bastos, J. K.; Braga, G. U. L., Furocoumarins and coumarins photoinactivate *Colletotrichum acutatum* and *Aspergillus nidulans* fungi under solar radiation. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2014**, 131, 74-83.
352. Villén, L.; Manjón, F.; Fresnadillo, D. G.; Orellana, G., Solar water disinfection by photocatalytic singlet oxygen production in heterogeneous medium. *Appl. Catal. B: Environ.* **2006**, 69, 1-9.
353. Bichai, F.; Polo-López, M. I.; Fernández Ibañez, P., Solar disinfection of wastewater to reduce contamination of lettuce crops by *Escherichia coli* in reclaimed water irrigation. *Water Res.* **2012**, 46, 6040-6050.
354. Magaraggia, M.; Faccenda, F.; Gandolfi, A.; Jori, G., Treatment of microbiologically polluted aquaculture waters by a novel photochemical technique of potentially low environmental impact. *J. Environ. Monit.* **2006**, 8, 923-931.
355. Nzambe Ta keki, J. K.; Ouk, T. S.; Zerrouki, R.; Faugeras, R. A.; Sol, V.; Brouillette, F., Synthesis and photobactericidal properties of a neutral porphyrin grafted onto lignocellulosic fibers. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, 62, 61-67.
356. Rahimi, R.; Fayyaz, F.; Rassa, M., The study of cellulosic fabrics impregnated with porphyrin compounds for use as photo-bactericidal polymers. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, 59, 661-668.
357. Mullera, M. P.; MacDougall, C.; Lim, M., Antimicrobial surfaces to prevent healthcare-associated infections: a systematic review. *J. Hosp. Infect.* **2016**, 92 (1), 7-13.
358. Yu, Q.; Wu, Z.; Chen, H., Dual-function antibacterial surfaces for biomedical applications. *Acta Biomater.* **2015**, 16, 1-13.

359. George, L.; Müller, A.; Röder, B.; Santala, V.; Efimov, A., Photodynamic self-disinfecting surface using pyridinium phthalocyanine. *Dyes Pigments*. **2017**, *147*, 334-342.
360. Fanchiotti, B. G.; Machado, M. P. Z.; Paula, L. C.; Durmuş, M.; Nyokong, T.; Gonçalves, A. S.; Romero da Silva, A., The photobleaching of the free and encapsulated metallic phthalocyanine and its effect on the photooxidation of simple molecules. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2016**, *165*, 10-23.
361. Alves, E.; Carvalho, C. M. B.; Tomé, J. P. C.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A. S.; Cunha, Â.; Mendo, S.; Almeida, A., Photodynamic inactivation of recombinant bioluminescent *Escherichia coli* by cationic porphyrins under artificial and solar irradiation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *35*, 1447-1454.
362. Thomas, A.; Dahl, D.; Midden, R.; Hartman, P. E., Pure singlet oxygen cytotoxicity for bacteria. *Photochem. Biol.* **1987**, *46*, 345-352.
363. Felgenträger, A.; Maisch, T.; Späth, A.; Schröder, J. A.; Bäuml, W., Singlet oxygen generation in porphyrin-doped polymeric surface coating enables antimicrobial effects on *Staphylococcus aureus*. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (38), 20598-20607.
364. Bezman, S. A.; Burtis, P. A.; Izod, T. P.; Thayer, M. A., Photodynamic inactivation of *E. coli* by rose bengal immobilized on polystyrene beads. *Photochem. Photobiol.* **1978**, *28*, 325-329.
365. Savino, A.; Angeli, G., Photodynamic inactivation of *E. coli* by immobilized or coated dyes on insoluble supports. *Water Res.* **1985**, *19*, 1465-1469.
366. D., F.; Funken, K.; Horneck, G.; Milow, B.; Ortner, J.; Sattlegger, M.; Schäfer, M.; Schmitz, C., Immobilized photosensitizers for solar photochemical applications. *Sol. Energy* **1999**, *65*, 71-74.
367. Krouit, M.; Granet, R.; Branland, P.; Verneuil, B.; Krausz, P., New photoantimicrobial films composed of porphyrinated lipophilic cellulose esters. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1651-1655.
368. Krouit, M.; Granet, R.; Krausz, P., Photobactericidal plastic films based on cellulose esterified by chloroacetate and a cationic porphyrin. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 10091-10097.

369. Benabbou, A. K.; Guillard, C.; Pigeot-Rémy, S.; Cantau, C.; Pigot, T.; Lejeune, P.; Derriche, Z.; Lacombe, S., Water disinfection using photosensitizers supported on silica. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2011**, *219* (1), 101-108.
370. DeMarco, C. E.; Cushing, L. A.; Frempong-Manso, E.; Seo, S. M.; Jaravaza, T. A.; Kaatz, G. W., Efflux related resistance to norfloxacin, dyes and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 3235-3239.
371. Wilson, M., Light activated antimicrobial coating for the continuous disinfection of surfaces. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2003**, *24*, 782-784.
372. Bonnett, R.; Buckley, D. G.; Burrow, T.; Galia, A. B.; Saville, B.; Songca, S. P., Photobactericidal materials based on porphyrins and phthalocyanines. *J. Mater. Chem.* **1993**, *3*, 323-324.
373. Bozja, J.; Sherrill, J.; Michielsen, S.; Stojiljkovic, I., Porphyrin-based, light activated antimicrobial materials. *J. Polym. Sci. Polym. Chem.* **2003**, *41*, 2297-2303.
374. Rutala, W. A.; Katz, E. B.; Sherertz, R. J.; Sarubbi, F. A., Environmental study of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemic in a burn unit. *J. Clin. Microbiol.* **1983**, *18*, 683-688.
375. Decraene, V.; Pratten, J.; Wilson, M., Cellulose acetate containing toluidine blue and rose bengal is an effective antimicrobial coating when exposed to white light. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 4436-4439.
376. Wainwright, M.; Byrne, M. N.; Gattrell, M. A., Phenothiazinium-based photobactericidal materials. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2006**, *84*, 227-230.
377. Zerdin, K.; Horsham, M. A.; Durham, R.; Wormell, P.; Scully, A. D., Photodynamic inactivation of bacterial spores on the surface of a photoactive polymer. *React. Funct. Polym.* **2009**, *69*, 821-827.
378. Alvarez, M. G.; Gómez, M. L.; Mora, S. J.; Milanesio, M. E.; Durantini, E. N., Photodynamic inactivation of *Candida albicans* using bridged polysilsesquioxane films doped with porphyrin. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 4032-4039.
379. Yeroslavsky, G.; Girshevitz, O.; Foster-Frey, J.; Donovan, D. M.; Rahimipour, S., Antibacterial and antibiofilm surfaces through polydopamine-assisted immobilization of lysostaphin as an antibacterial enzyme. *Langmuir* **2015**, *31* (3), 1064-1073.

380. Miras, M. C.; Silber, J. J.; Sereno, L., Two-electron oxidation of *N,N,N',N'*-tetramethyl naphthidine in acetonitrile. The reactivity of its dication to aromatic nucleophilic substitution by pyridine. *J. Electroanal. Chem.* **1986**, *201*, 367-386.
381. Durantini, J.; Morales, G. M.; Santo, M.; Funes, M.; Durantini, E. N.; Fungo, F.; Dittrich, T.; Otero, L.; Gervaldo, M., Synthesis and characterization of porphyrin electrochromic and photovoltaic electropolymers. *Org. Electron.* **2012**, *13*, 604–614.
382. Xu, T. H.; Lu, R.; Qiu, X. P.; Liu, X. L.; Xue, P. C.; Tan, C. H.; Bao, C. Y.; Zhao, Y. Y., Synthesis and characterization of carbazole based dendrimers with porphyrin cores. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006*, 4014-4020.
383. Klessinger, M.; Michl, J., *Excited states and photochemistry of organic molecules*. VCH: Estados Unidos, 1995.
384. Rettig, W.; Strehmel, B.; Schrader, S.; Seifert, H., *Applied fluorescence in chemistry, biology and medicine*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 1999.
385. Milanesio, M. E.; Alvarez, M. G.; Silber, J. J.; Rivarola, V.; Durantini, E. N., Photodynamic activity of monocationic and non-charged methoxyphenyl porphyrin derivatives in homogeneous and biological medium. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, *2*, 926-933.
386. García, E.; Texter, J., Electrochemical Oxidation of Primary Amides in Water/AOT/Toluene Reverse Microemulsions. *J. Colloid Interface Sci.* **1994**, *162* (1), 262-264.
387. Ninham, B. W.; Larsson, K.; Lo Nostro, P., Two sides of the coin. Part 1. Lipid and surfactant self-assembly revisited. *Colloid Surf. B: Biointerfaces* **2017**, *152*, 326-338.
388. Silber, J. J.; Biasutti, A.; Abuin, E.; Lissi, E., Interactions of small molecules with reverse micelles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1999**, *82*, 189-252.
389. Correa, N. M.; Durantini, E. N.; Silber, J. J., Substituent effects on binding constants of carotenoids to n-Heptane/AOT reverse micelles. *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *240* (2), 573-580.
390. Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H. A.; Staley, J. T.; Williams, S. T.; Hensyl, W. R., *Manual of determinative bacteriology*. Ninth ed.; Bergey's, Ed. Baltimore, MD, 1994.

391. Herigstad, B.; Hamilton, M.; Heersink, J., How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J. Microbiol. Methods* **2001**, *44*, 121-129.
392. Mamone, L.; Ferreyra, D.; Gándara, L.; Di Venosa, G.; Vallecorsa, P.; Sáenz, D.; Calvo, G.; Batlle, A.; Buzzola, F.; Durantini, E. N.; Casas, A., Photodynamic inactivation of planktonic and biofilm growing bacteria mediated by a meso-substituted porphyrin bearing four basic amino groups. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2016**, *161*, 222-229.
393. Durantini, E. N., Synthesis of meso-nitrophenylporphyrins covalently linked to a polyphenylene chain bearing methoxy groups. *J. Porphyr. Phthalocya.* **2000**, *4*, 233-242.
394. Prato, M.; Maggini, M.; Giacometti, C.; Scorrano, G.; Sandona, G.; Farnia, G., Synthesis and electrochemical properties of substituted fulleropyrrolidines. *Tetrahedron* **1996**, *52* (14), 5221-5234.
395. Obondi, C. O.; Lim, G. N.; D'Souza, F., Triplet-triplet excitation transfer in palladium porphyrin-fullerene and platinum porphyrin-fullerene dyads. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119* (1), 176-185.
396. Scalise, I.; Durantini, E. N., Synthesis, properties and photodynamic inactivation of *Escherichia coli* using a cationic and a noncharged Zn(II) pyridyloxyphtalocyanine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2037-3045.
397. Wang, M.; Maragani, S.; Huang, L.; Jeon, S.; Canteenwala, T.; Hamblin, M. R.; Chiang, L. Y., Synthesis of decacationic [60]fullerene decaiodides giving photoinduced production of superoxide radicals and effective PDTmediation on antimicrobial photoinactivation. *Eur. J. Med. Chem.* **2013** *63*, 170-184.
398. Issa, S.; Walchshofer, N.; Kassab, I.; Termoss, H.; Chamat, S.; Geahchan, A.; Bouaziz, Z., Synthesis and antiproliferative activity of oxazinocarbazole and *N,N*-bis(carbazolylmethyl)amine derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 2567-2577.
399. Durantini, J.; Otero, L.; Funes, M.; N., D. E.; F., F.; Gervaldo, M., Electrochemical oxidation-induced polymerization of 5,10,15,20-tetrakis[3-(*N*-ethylcarbazoyl)]porphyrin. Formation and characterization of a novel electroactive porphyrin thin film. *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 4126-4134.
400. Maximiano, R. V.; Piovesan, E.; Zílio, S. C.; Machado, A. E. H.; Paula, R.; Cavaleiro, J. A. S.; Borissevitch, I. E.; Ito, A. S.; Gonçalves, P. J.; Barbosa Neto, N. M.,

Excited state absorption investigation of a cationic porphyrin derivative. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2010**, *214*, 115-120.

401. Baskin, J. S.; Yu, H. Z.; Zewail, A. H., Ultrafast dynamics of porphyrins in the condensed phase: I. Free base tetraphenylporphyrin. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 9837-9844.

402. Hashimoto, T.; Choe, Y. K.; Nakano, H.; Hirao, K., Theoretical study of the Q and B bands of free base, magnesium, and zinc porphyrins, and their derivatives. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 1894-1904.

403. Schuster, D. I.; Li, K.; Guldi, D. M.; Palkar, A.; Echegoyen, L.; Stanisky, C.; Cross, R. J.; Niemi, M.; Tkachenko, N. V.; Lemmetyinen, H., Azobenzene linked porphyrin-fullerene dyads. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15973-15982.

404. Llansola-Portoles, M. J.; Gust, D.; Moore, T. A.; Moore, A. L., Artificial photosynthetic antennas and reaction centers. *C. R. Chim.* **2017**, *20* (3), 296-313.

405. Streckyte, G.; Rotomskis, R., Phototransformations of porphyrins in aqueous and micellar media. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1993**, *18*, 259-263.

406. Andrade, S. M.; Teixeira, C.; Togashi, D. M.; Costa, S. M. B.; Sobral, A. J. F. N., Self-association of free base porphyrins with aminoacid substituents in AOT reverse micelles. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2006**, *178*, 225-235.

407. Yu, J. H.; Weng, Y. X.; Wang, X. S.; Zhang, L.; Zhang, B. W.; Cao, Y., The triplet excited state changes of amphiphilic porphyrins with different side-chain length in AOT reverse micelles. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2003**, *156* (1-3), 139-144.

408. Milanesio, M. E.; Alvarez, M. G.; Durantini, E. N., Methoxyphenylporphyrin derivatives as phototherapeutic agents. *Curr. Bioact. Compd.* **2010**, *6*, 97-105.

409. Rehm, D.; Weller, A., Kinetics of fluorescence quenching by electron and H-atom transfer. *Isr. J. Chem.* **1970**, *8*, 259-271.

410. Fungo, F.; Milanesio, M. E.; Durantini, E. N.; Otero, L.; Dittrich, T., Optically induced switch of the surface work function in TiO₂/porphyrin-C₆₀ dyad system. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 2107-2112.

411. Poddutoori, P. K.; Sandanayaka, A. S. D.; Zarrabi, N.; Hasobe, T.; Ito, O.; van der Est, A., Sequential charge separation in two axially linked phenothiazine-aluminum(III) porphyrin-fullerene triads. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 709-717.

412. D'Souza, F.; Ito, O., Supramolecular donor-acceptor hybrids of porphyrins/phthalocyanines with fullerenes/carbon nanotubes: electron transfer, sensing, switching, and catalytic applications. *Chem. Commun.* **2009**, 0 (33), 4913-4928.
413. Unden, G.; Bongaerts, J., Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1320, 217-234.
414. Fukuzumi, S.; Imahori, H.; Yamada, H.; El-Khouly, M. E.; Fujitsuka, M.; Ito, O.; Guldi, D. M., Catalytic effects of dioxygen on intramolecular electron transfer in radical ion pairs of zinc porphyrin-linked fullerenes. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 2571-2575.
415. Fukuzumi, S.; Imahori, H.; Okamoto, K.; Yamada, H.; Fujitsuka, M.; Ito, O.; Guldi, D. M., Uphill photooxidation of NADH analogues by hexyl viologen catalyzed by zinc porphyrin linked fullerenes. *J. Phys. Chem. A* **2002**, 106, 1903-1908.
416. Dallas, P.; Rogers, G.; Reid, B.; Taylor, R. A.; Shinohara, H.; Briggs, G. A. D.; Porfyrakis, K., Charge separated states and singlet oxygen generation of mono and bis adducts of C₆₀ and C₇₀. *Chem. Phys.* **2016**, 465-466, 28-39.
417. Wang, R.; Qu, R.; Jing, C.; Zhai, Y.; An, Y.; Shi, L., Zinc porphyrin/fullerene/block copolymer micelle for enhanced electron transfer ability and stability. *RSC Adv.* **2017**, 7, 10100-10107.
418. Gomes, A.; Fernandes, E.; Lima, J. L. F. C., Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **2005**, 65, 45-80.
419. Redmond, R. W.; Gamlin, J. N., A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochem. Photobiol.* **1999**, 70, 391-475.
420. Silber, J. J.; Biasutti, A.; Abuin, E.; Lissi, E., Interactions of small molecules with reverse micelles. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1999**, 82, 189-252.
421. Butkhuzi, T.; Kurtanidze, M.; Chaladze, R.; Gvaramia, M.; Rukhadze, M.; Bezarashvili, G.; Sigua, K.; Pradhan, P., Investigation of influence of nonionic additives on structural changes of water droplets encapsulated in AOT reverse micelles by instrumental methods. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2014**, 460, 123-129.
422. Mehta, S. K.; Kaur, K.; Sharma, S.; Bhasin, K. K., Incorporation of aromatic heterocyclic compounds in reverse micelles: a physicochemical and spectroscopic approach. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2007**, 298 (3), 252-261.

423. Borsarelli, C. D.; Durantini, E. N.; García, N. A., Singlet molecular oxygen-mediated photooxidation of nitrophenolic compounds in water-in-oil microemulsions. A kinetic study. *J. Chem. Soc. Perkin Trans* **1996**, 2, 2009-2013.
424. Suchetti, C. A.; Durantini, E. N., Monomerization and photodynamic activity of Zn(II) tetraalkyltetrapyridinoporphyrinium derivatives in AOT reverse micelles. *Dyes Pigm.* **2007**, 74, 630-635.
425. Ruoff, R. S.; Tse, D. S.; Malhotra, R.; Lorents, D. C., Solubility of fullerene (C₆₀) in a variety of solvents. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97 (13), 3379-3383.
426. Zhou, X.; Liu, J.; Jin, Z.; Gu, Z.; Wu, Y.; Sun, Y., Solubility of fullerene C₆₀ and C₇₀ in toluene, *o*-xylene and carbon disulfide at various temperatures. *Fullerene. Sci. Techn.* **1997**, 5 (1), 285-290.
427. Saboktakin, M. R.; Tabatabae, R. M., The novel polymeric systems for photodynamic therapy technique. *Int. J. Biol. Macromolec.* **2014**, 65, 398-414.
428. Altman, F. P., Tetrazolium salts and formazans. *Prog. Histochem Cyto.* **1976**, 9 (3), III-VI, 1-51.
429. Ehrenshaft, M.; Deterding, L. J.; P., M. R., Tripping up Trp: modification of protein tryptophan residues by reactive oxygen species, modes of detection, and biological consequences. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, 89, 220-228.
430. Zeng, Z.; Qiao, R.; Zhou, J.; Xia, S.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Chen, J.; Wang, X.; Zhang, B., Photodynamic properties of dipeptide-modified hypocrellin B derivatives: the role of tyrosine and tryptophan groups. *J. Phys. Chem. B.* **2007**, 111 (14), 3742-3749.
431. Reid, L. O.; Roman, E. A.; Thomas, A. H.; Dántola, M. L., Photooxidation of tryptophan and tyrosine residues in human serum albumin sensitized by pterin: a model for globular protein photodamage in skin. *Biochemistry* **2016**, 55 (34), 4777-4786.
432. La Penna, M. A.; Alvarez, M. G.; Yslas, E. I.; Rivarola, V.; Durantini, E. N., Characterization of photodynamic effects of meso-tetrakis-(4-methoxyphenyl) porphyrin: biological consequences in a human carcinoma cell line. *Dyes Pigments* **2001**, 49, 75-82.
433. Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B., Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1995**, 24, 663-1021.

434. Montenegro, M. A.; Nazareno, M. A.; Durantini, E. N.; Borsarelli, C. D., Singlet molecular oxygen quenching ability of carotenoids in reverse micelle membrane mimetic system. *Photochem. Photobiol.* **2002**, 75, 353-361.
435. Ochsner, M. J., Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *Photochem. Photobiol. B* **1997**, 39, 1-18.
436. Ergaieg, K.; Chevanne, M.; Cillard, J.; Seux, R., Involvement of both Type I and Type II mechanisms in Gram(+) and Gram(-) bacteria photosensitization by a meso-substituted cationic porphyrin. *Sol. Energ.* **2008**, 82, 1107-1117.
437. Castaño, C.; Vignoni, M.; Vicendo, P.; Oliveros, E.; Thomas, A. H., Degradation of tyrosine and tryptophan residues of peptides by type I photosensitized oxidation. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2016**, 164, 226-235.
438. García-Díaz, M.; Huang, Y.-Y.; Hamblin, M. R., Use of fluorescent probes for ROS to tease apart Type I and Type II photochemical pathways in photodynamic therapy. *Methods* **2016**, 109, 158-166.
439. Straight, S. D.; Andréasson, J.; Kodis, G.; Moore, A. L.; Moore, T. A.; Gust, D., Photochromic control of photoinduced electron transfer. Molecular double-throw switch. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2717-2724.
440. Maisch, T.; Bosl, C.; Szeimies, R. M.; Lehn, N.; Abels, C., Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49, 1542-1552.
441. Mora, S. J.; Milanesio, M. E.; Durantini, E. N., Spectroscopic and photodynamic properties of 5,10,15,20-tetrakis[4-(3-*N,N*-dimethylaminopropoxy)phenyl]porphyrin and its tetracationic derivative in different media. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2013**, 270, 75-84.
442. French, G. L.; Otter, J. A.; Shannon, K. P.; Adams, N. M. T.; Watling, D.; Parks, M. J., Tackling contamination of the hospital environment by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a comparison between conventional terminal cleaning and hydrogen peroxide vapour decontamination. *J. Hosp. Infect.* **2004**, 57, 31-37.
443. Reddi, E.; Ceccon, M.; Valduga, G.; Jori, G.; Bommer, J. C.; Elisei, F.; Latterini, L.; Mazzucato, U., Photophysical properties and antibacterial activity of meso-substituted cationic porphyrins. *Photochem. Photobiol.* **2002**, 75, 462-470.

444. Banfi, S.; Caruso, E.; Buccafurni, L.; Battini, V.; Zazzaron, S.; Barbieri, P.; Orlandi, V., Antibacterial activity of tetraaryl porphyrin photosensitizers: an in vitro study on Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2006**, *85*, 28-38.
445. Di Palma, M. A.; Alvarez, M. G.; Durantini, E. N., Photodynamic action mechanism mediated by Zinc(II) 2,9,16,23-Tetrakis[4-(*N*-methylpyridyloxy)]phthalocyanine in *Candida albicans* cells. *Photochem. Photobiol.* **2015**, *91*, 1203-1209.
446. Rand, A. A.; Barclay, L. R. C., Photo-oxidations initiated by UV radiation of urocanic acid and its methyl ester in solution, micelles, and lipid bilayers: TYPE I (free radical) or TYPE II (singlet oxygen) mechanisms depend on the medium. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2009**, *208*, 79-90.
447. Kasimova, K. R.; Sadasivam, M.; Landi, G.; Sarna, T.; Hamblin, M. R., Potentiation of photoinactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria mediated by six phenothiazinium dyes by addition of azide ion. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2014**, *13* (11), 1541-1548.
448. Garg, V.; Kodis, G.; Liddell, P. A.; Terazono, Y.; Moore, T. A.; Moore, A. L.; Gust, D., Artificial photosynthetic reaction center with a coumarin-based antenna system. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117* (38), 11299-11308.
449. Rozzi, C. A.; Falke, S. M.; Spallanzani, N.; Rubio, A.; Molinari, E.; Brida, D.; Maiuri, M.; Cerullo, G.; Schramm, H.; Christoffers, J.; Lienau, C., Quantum coherence controls the charge separation in a prototypical artificial light-harvesting system. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1602-1609.
450. Morrison, R. T.; Boyd, R. N., Química orgánica. 5ta ed.; Longman, A. W., Ed. México, 1998.
451. Castillo, U. J.; Guadarrama, P.; Fomine, S., Large face to face tetraphenylporphyrin/fullerene nanoaggregates. A DFT study. *Org. Electron.* **2013**, *14*, 2617-2627.
452. Wróbel, D.; Lewandowska, K., Covalent dyads of porphyrin–fullerene and perylene–fullerene for organic photovoltaics: spectroscopic and photocurrent studies. *Opt. Mater.* **2011**, *33*, 1424-1428.
453. Hall Jr., H. K., Correlation of the base strengths of amines. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79* (20), 5441-5444.

454. Hancock, R. E., The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiol.* **1997**, *5* (1), 37-42.
455. Bard, A. J.; Faulkner, L. R., Introduction and Overview of Electrode Processes. In *Electrochemical methods: fundamentals and applications.*, 2nd ed.; Sons, J. W., Ed. Estados Unidos, 2000; pp 28-42.
456. Cosnier, S.; Karyakin, A., Recent trends in polypyrrole electrochemistry, nanostructuration, and applications. In *Electropolymerization: concepts, materials and applications*, KGaA, W.-V. V. G. C., Ed. Weinheim, Alemania, 2010.
457. Gervaldo, M.; Fungo, F.; Durantini, E. N.; Silber, J. J.; Sereno, L. E.; Otero, L., Carboxyphenyl metalloporphyrins as photosensitizers of semiconductor film electrodes. A study of the effect of different central metals. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 20953–20962.
458. Suarez, M. B.; Durantini, J.; Santo, M.; Otero, L.; Milanesio, M. E.; Durantini, E.; Gervaldo, M., Electrochemical generation of porphyrin-porphyrin and porphyrin-C₆₀ polymeric photoactive organic heterojunctions. *Electrochim. Acta* **2014**, *133*, 399-406.
459. Durantini, J.; Suarez, M. B.; Santo, M.; Durantini, E.; Dittrich, T.; Otero, L.; Gervaldo, M., Photoinduced charge separation in organic-organic heterojunctions based on porphyrin electropolymers. Spectral and time dependent surface photovoltage study. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 4044-4051.
460. Arredondo-Espinoza, E. U.; López-Cortina, S. T.; Ramírez-Cabrera, M. A.; Balderas-Rentería, I. B., Synthesis and photodynamic activity of unsymmetrical A₃B tetraarylporphyrins functionalized with L-glutamate and their Zn(II) and Cu(II) metal complex derivatives. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, *82*, 327-336.
461. Skwor, T. A.; Klemm, S.; Zhang, H.; Schardt, B.; Blaszczyk, S.; Bork, M. A., Photodynamic inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: A metalloporphyrin comparison. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2016**, *165*, 51-57.
462. Reddy, M. H. V.; Al-Shammari, R. M.; Al-Attar, N.; Rogers, L.; Lopez, S.; Forster, R. J.; Senge, M. O.; Keyes, T. E.; Rice, J. H., Fractal structures in n-phenyl-porphyrin J-aggregate films. *Mater. Chem. Phys.* **2014**, *143*, 963-968.
463. Ballatore, M. B.; Spesia, M. B.; Milanesio, M. E.; Durantini, E. N., Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of porphyrinefullerene C₆₀ dyads with

application in the photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 83, 685-694.

464. Mosinger, J.; Mosinger, B., Photodynamic sensitizers assay: rapid and sensitive iodometric measurement. *Experientia* **1995**, 51, 106-109.

465. Rodríguez-Hernández, J., Antimicrobial micro/nanostructured functional polymer surfaces. In *Nanobiomaterials in antimicrobial therapy. Applications of nanobiomaterials*, Inc., E., Ed. William Andrew: 2016; Vol. 6, pp 153-192.

466. Bhattacharjee, S., The language of reactive oxygen species signaling in plants. *J. Bot.* **2012**, 8 ((9-10)), 1-22.

467. Girotti, A. W., Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J. Photochem. Photobiol. A* **2001**, 63, 103-113.

468. Boyce, J. M.; Pittet, D., Guideline for hand hygiene in health-care settings: recommendation of the healthcare infection control practices advisory committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA hand hygiene task force. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2002**, 23 (12), S3-40.

469. Alves, E.; Faustino, M. A. F.; Neves, M. G. P. M. S.; Cunha, A.; Tomé, J.; Almeida, A., An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. *Fut. Med. Chem.* **2014**, 6, 141-164.

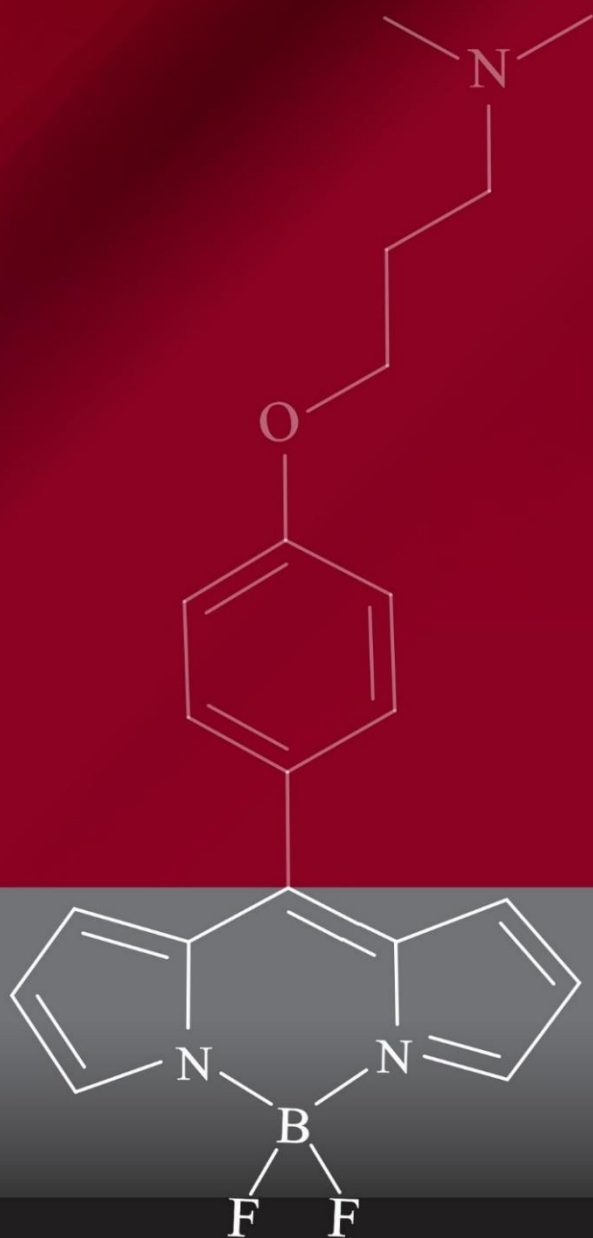
470. Madoux-Humery, A.-S.; Dorner, S.; Sauvé, S.; Aboulfadl, K.; Galarneau, M.; Servais, P.; Prévost, M., Temporal variability of combined sewer overflow contaminants: evaluation of wastewater micropollutants as tracers of fecal contamination. *Water Res.* **2013**, 47, 4370-4382.

471. Masilela, N.; Kleyi, P.; Tshentu, Z.; Priniotakis, G.; Westbroek, P.; Nyokong, T., Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* using low symmetrically substituted phthalocyanines supported on a polystyrene polymer fiber. *Dyes Pigm.* **2013**, 96, 500-508.

472. Osifeko, O. L.; Nyokong, T., Applications of lead phthalocyanines embedded in electrospun fibers for the photoinactivation of *Escherichia coli* in water. *Dyes Pigm.* **2014**, 111, 8-15.

473. Wang, X.; Bai, F.-Q.; Liu, Y.-T.; Wang, J.; Zhang, H.-X., Theoretical investigation on the spectroscopic properties of Zn porphyrin and Zn tetrapyrin. *Syn. Metals* **2016**, *213*, 18-24.
474. Dąbrowski, J. M.; Pucelik, B.; Regiel-Futyr, A.; Brindell, M.; Mazuryk, O.; Kyzioł, A.; Stochel, G.; Macyk, W.; Arnaut, L. G., Engineering of relevant photodynamic processes through structural modifications of metallotetrapyrrolic photosensitizers. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *325*, 67-101.
475. Owens, J. W.; Smith, R.; Robinson, R.; Robins, M., Photophysical properties of porphyrins, phthalocyanines and benzochlorins. *Inorg. Chim. Acta* **1998**, *279*, 226-231.
476. Ikemoto, J.; Takimiya, K.; Aso, Y.; Otsubo, T.; Fujitsuka, M.; Ito, O., Porphyrinoligoyhiophenefullerene triads as an efficient intramolecular electron-transfer system. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 309-311.
477. Mroz, P.; Bhaumik, J.; Dogutan, D. K.; Aly, Z.; Kamal, Z.; Khalid, L.; Kee, H. L.; Bocian, D. F.; Holten, D.; Lindsey, J. S.; Hamblin, M. R., Imidazole metalloporphyrins as photosensitizers for photodynamic therapy: role of molecular charge, central metal and hydroxyl radical production. *Cancer Lett.* **2009**, *282* (1), 63-76.
478. Jung, H.; Sang, P.; Lee, E.; Young Park, J., Optical property of atomically thin titanium-oxide nanosheet for ultraviolet filtration. *Thin Solid Films* **2017**, *636* 99-106.
479. Sharma, M.; Visai, L.; Bragheri, F.; Cristiani, I.; Gupta, P. K.; Speziale, P., Toluidine blue-mediated photodynamic effects on *Staphylococcal* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 299-305.
480. Pereira, C. A.; Romeiro, R. L.; Costa, A. C.; Machado, A. K.; Junqueira, J. C.; Jorge, A. O., Susceptibility of *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic inactivation: an *in vitro* study. *Lasers Med. Sci.* **2011**, *26* (3), 341-348.
481. Almatroudi, A.; Gosbell, I. B.; Hua, H.; Jensen, S. O.; Espedido, B. A.; Tahir, S.; Glasbey, T. O.; Legge, P.; Whiteley, G.; Deva, A.; Vickery, K., *Staphylococcus aureus* dry surface biofilms are not killed by sodium hypochlorite: implications for infection control. *J. Hosp. Infect.* **2016**, *93*, 263-270.
482. Cavaleiro, J. A. S.; Gerner, H.; Lacerda, P. S. S.; MacDonald, J. G.; Mark, G.; Neves, M. G. P. M. S.; Nohr, R. S.; Schuchmann, H. P.; van Sonntag, C.; Tome, A. C., Singlet

oxygen formation and photostability of meso-tetraarylporphyrin derivatives and their copper complexes *J. Photochem. Photobiol. A* **2001**, *144*, 131-140.



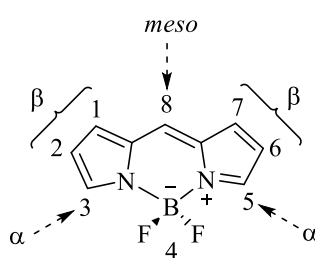
CAPÍTULO VII

Anexo

CAPÍTULO VII

7. ANEXO. BORODIPIRROMETENOS (BODIPYS)

Los BODIPYs, a menudo denominados “hermanos menores de las porfirinas”, están basados en un núcleo de 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indaceno, constituido por dos núcleos pirrólicos y un grupo BF₂, formando un complejo dipirrometénico·BF₂.¹ La rigidez introducida por la complejación del boro impide la isomerización *cis-trans* y la torsión de la cadena metina interpirrólica, problemas comúnmente asociados con colorantes de cianina flexibles. El Esquema A1 muestra la estructura y la nomenclatura IUPAC para el BODIPY.



Esquema A1. Sistema de numeración IUPAC para el BODIPY.

Los BODIPYs se han estudiado debido a sus importantes propiedades, tales como altos rendimientos cuánticos de fluorescencia, elevada estabilidad química y fotoquímica, eficiente emisión láser en disolución y sobre todo, versatilidad química.² Por lo tanto, los BODIPY han recibido un interés sustancial como fluoróforos en bioimagen, marcadores biológicos y en ensayos de fluorescencia.³ Además, las estructuras BODIPY se han modificado para reducir la fluorescencia y aumentar el entrecruzamiento de singlete a triplete para aplicaciones en terapia fotodinámica (PDT).² En los últimos años, los BODIPY se han propuesto como fotosensibilizadores con aplicaciones potenciales para inactivar células microbianas.⁴⁻⁶

La investigación que se presenta en este anexo de la tesis doctoral, surge al utilizar *meso*-[4-(3-*N,N*-dimetilamino)propoxil]dipirrometano (DPM2, sección 3.5.10.) como reactivo de partida para la síntesis de un BODIPY. El desarrollo de este trabajo se llevó a cabo en colaboración con el Lic. Maximiliano L. Agazzi para la comparación exhaustiva con otros derivados de BODIPYs.

METODOLOGÍA

A continuación se detallan los procesos de síntesis y procedimientos que no fueron previamente descritos en el Capítulo III.

1,3,5,7-Tetrametil-8-[4-(N,N-dimetilamino)fenil]-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (BODIPY1). Una solución de 2,4-dimetilpirrol (620 ml, 6,02 mmol), 4-(N,N-dimetilamino)benzaldehído (450 mg, 3,02 mmol) y TFA (50 ml, 0,65 mmol) en 150 ml de CH₂Cl₂ se agitó durante 12 h bajo una atmósfera de argón a temperatura ambiente. Transcurrido dicho tiempo, el análisis de TLC empleando CH₂Cl₂ como fase móvil, mostró un consumo relevante del aldehído. Luego, se agregó a la mezcla de reacción, DDQ (681 mg, 3,00 mmol) disuelto en 50 ml de CH₂Cl₂ y se agitó durante 20 min. A continuación, se añadió un exceso de TEA (9 ml, 64,6 mmol) y BF₃.OEt₂ (9 ml, 72,9 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 12 h. La fase orgánica se lavó con agua y se secó con Na₂SO₄. El solvente se evaporó a presión reducida. El producto se purificó mediante cromatografía en columna *flash* (gel de sílice, CH₂Cl₂) y se obtuvo el BODIPY 1 con un rendimiento del 25% (275 mg). TLC (CH₂Cl₂) R_f = 0,60. ¹H NMR (CDCl₃, TMS) δ [ppm] 1,48 (s, 6 H), 2,55 (s, 6 H), 3,04 (s, 6 H, -N(CH₃)₂), 5,97 (s, 2 H, pirrol), 6,82 (d, 2H, J = 8,7 Hz, Ar), 7,08 (d, 2H, J = 8,7 Hz, Ar). APPI-MS [m/z] 368,2110 (M+H)⁺ (367,2031 calculado para C₂₁H₂₄BF₂N₃).

8-[4-(3-(N,N-Dimetilamino)propoxi)fenil]-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (BODIPY2). Una mezcla de *meso*-[4-(3-N,N-dimetilaminopropoxi)fenil]dipirrometano (829 mg, 2,57 mmol) y DDQ (1,06 g, 4,67 mmol) en 130 ml de CH₂Cl₂ se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. A continuación, se añadió TEA (12 ml, 86,1 mmol) y BF₃.OEt₂ (12 ml, 97,2 mmol). La mezcla se agitó durante 12 h adicionales a temperatura ambiente y luego se lavó con agua dos veces (10 ml cada vez). El disolvente se evaporó a presión reducida. La cromatografía en columna *flash* (gel de sílice, CH₂Cl₂/Et₃N 1%) produjo 114 mg (12%) del BODIPY 2 puro. TLC (CH₂Cl₂/Et₃N 1%) R_f = 0,74. ¹H NMR (CDCl₃, TMS) δ [ppm] 1,96 (m, 2H), 2,30 (s, 6H, -N(CH₃)₃), 2,67 (t, 2H, J = 6,0 Hz), 4,11 (t, 2H, J = 6,1 Hz), 6,55 (dd, 2H, J = 1,7; 4,2 Hz, pirrol), 6,97 (d, 2H, J = 4,2 Hz, pirrol), 7,04 (d, 2H, J = 8,3 Hz, Ar), 7,53 (d, 2H, J = 8,3 Hz, Ar), 7,92 (br, 2H, pirrol). APPI-MS [m/z] 370,1902 (M+H)⁺ (369,1824 calculado para C₂₀H₂₂BF₂N₃O).

1,3,5,7-Tetrametil-8-[4-(N,N,N-trimetilamino)fenil]-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (BODIPY3). Una mezcla de BODIPY 1 (20 mg, 0,052 mmol) y yoduro de metilo

(200 ml, 3,21 mmol) en 2 ml de *N,N*-dimetilformamida (DMF) se agitó durante 72 h a 40°C. Los disolventes se eliminaron al vacío para obtener 25 mg (96%) del BODIPY 3. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, TMS) δ [ppm] 1,53 (s, 6H), 2,46 (s, 6H), 3,66 (s, 9H, -N(CH₃)₃), 6,21 (s, 2H, pirrol), 7,71 (d, 2H, *J* = 8,8 Hz, Ar), 8,14 (d, 2H, *J* = 8,8 Hz, Ar). APPI-MS [m/z] 383,2344 (M+H)⁺ (382,2261 calculado para C₂₂H₂₇BF₂N₃).

8-[4-(3-(*N,N,N*-trimetilamino)propoxi)fenil]-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indaceno (BODIPY4). Una mezcla de BODIPY 2 (10 mg, 0,027 mmol) y yoduro de metilo (200 ml, 3,21 mmol) en 2 ml de DMF se agitó durante 72 h a 40°C. Los disolventes se eliminaron al vacío para producir 15 mg (95%) del BODIPY 4. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, TMS) δ [ppm] 2,18 (m, 2 H), 3,04 (s, 9 H, -N(CH₃)₃), 3,37 (t, 2H, *J* = 6,2 Hz), 4,17 (t, 2H, *J* = 6,0 Hz), 6,69 (dd, 2H, *J* = 1,8; 4,2 Hz, pirrol), 7,02 (d, 2H, *J* = 4,2 Hz, pirrol), 7,17 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz, Ar), 7,66 (d, 2H, *J* = 8,3 Hz, Ar), 8,09 (br, 2H, pirrol). APPI-MS [m/z] 441,2763 (M+H)⁺ (440,2679 calculado para C₂₅H₃₃BF₂N₃O).

Estudios espectroscópicos. Los espectros de emisión de fluorescencia en estado estacionario se obtuvieron excitando las muestras a λ_{exc} = 470 nm. El rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) de los BODIPYs se calculó mediante la comparación del área por debajo del espectro de emisión corregido, empleando fluoresceína como molécula de referencia (Φ_F = 0,92 en una solución 0,1 M de NaOH).⁷

La desactivación del estado excitado singlete de los BODIPYs ocasionado por KI, se investigó a partir de la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q]$$

donde *I*₀ e *I* son las intensidades de fluorescencia de los BODIPY en ausencia y en presencia de KI, *k_q* representa la constante de velocidad de inactivación de la biomolécula, τ₀ es el tiempo de vida excitado del BODIPY en ausencia de KI, [Q] es la concentración de KI y *K_{SV}* es la constante de desactivación de Stern-Volmer. Para profundizar sobre esta ecuación ver la sección 4.7.1. del Capítulo IV.

Fotooxidación de 1,3-difenilisobenzofurano. Se irradiaron soluciones de 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF, 20 mM) y los BODIPYs en DMF o en micelas inversas de *n*-heptano/AOT (0,1 M)/agua (W₀=10) con luz monocromática (λ_{irr} = 500±5 nm con absorbancia de 0,1). La cinética de fotooxidación de DPBF se estudió siguiendo la

disminución de la absorbancia a 413 nm. Las constantes de velocidad observadas (k_{obs}) se obtuvieron mediante un ajuste lineal de la gráfica logarítmica de $\ln(A_0/A)$ en función del tiempo. Los valores de los rendimientos cuánticos de producción de $O_2(^1\Delta_g)$ (Φ_Δ) en DMF, se calcularon comparando las k_{obs} para los BODIPYs con la correspondiente al fullereno C_{60} , molécula empleada como referencia. Además, la fotooxidación de DPBF por BODIPYs, se evaluó en presencia de diferentes concentraciones de KI (10 y 50 mM) en DMF con un 5% de agua.

Generación de especies de yodo. Los espectros UV-visibles de una solución que contiene BODIPY (1 μ M) y 10 mM de KI en DMF/5% de agua se realizaron antes y después de la irradiación con luz visible (5, 10, 15 y 30 min) bajo condiciones aeróbicas. Además, el mismo experimento se llevó a cabo en una atmósfera de argón. La solución diluida de Lugol (20 mM) se usó para obtener espectros de referencia en el mismo solvente. También, se realizó un control irradiando de KI en ausencia de BODIPY.

PDI de microorganismos con KI. La adición de KI se llevó a cabo usando una solución *stock* preparada en agua de concentración 1 M. Las células microbianas se incubaron con diferentes concentraciones de KI (10, 25 y 50 mM) durante 10 min en la oscuridad a 37 °C. Luego, se añadió el fotosensibilizador y las células se incubaron durante 30 min en la oscuridad a 37 °C.

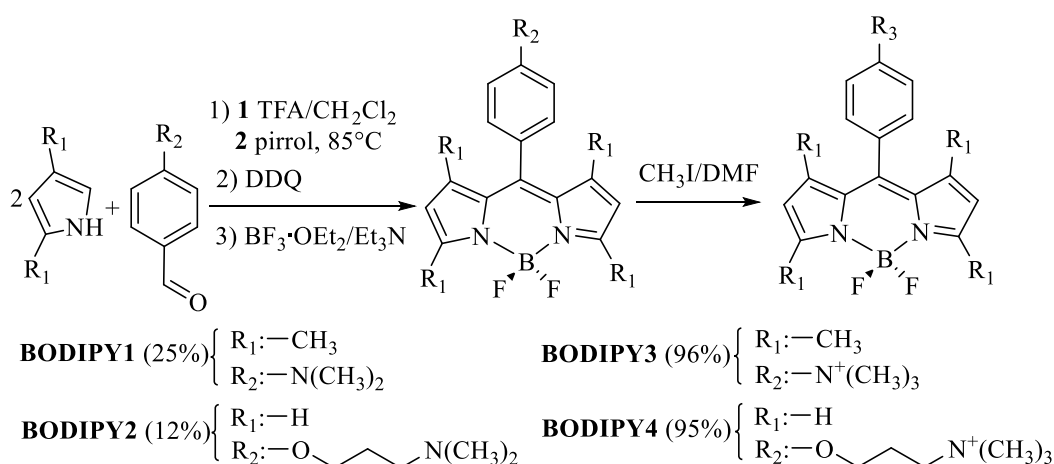
Imágenes de microscopía de fluorescencia. Los estudios de microscopía se llevaron a cabo con un Zeiss Microscopio de fluorescencia Axiophot (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) equipado con una lámpara de mercurio HBO 100 W. Las imágenes se capturaron utilizando una cámara AxioCam HRC y posteriormente se procesaron utilizando AxioVision Rel. 4.3 software. Las imágenes de fluorescencia de los BODIPYs incorporados a las células microbianas, se observaron usando Set Filter 25 (488025-0000-000, Carl Zeiss, excitación TBP 400 + 495 + 570, divisor de haz TFT 410 + 505 + 585, emisión TBP 460 + 530 + 625). Las imágenes se registraron luego de tratar los cultivos celulares con los fotosensibilizadores durante 30 min en la oscuridad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis de BODIPYs. Los procedimientos sintéticos para obtener BODIPYs catiónicos se resumen en el Esquema A2. El BODIPY 1 se sintetizó a partir de 4-(N,N-

dimetilamino)benzaldehído y 2,4-dimetilpirrol utilizando ácido TFA como catalizador. Por otro lado, el BODIPY 2 se obtuvo a partir de 4-[3-(*N,N*-dimetilamino)propoxi]benzaldehído y un gran exceso de pirrol. La mezcla, sin catalizador, se calentó a 85 °C. Los dipirrometanos se oxidaron con DDQ dando como resultado un dipirrometileno que finalmente se convierte en BODIPY al formar un complejo con el trifluorboroeterato. La base TEA actuó como el catalizador de la síntesis.⁸ Luego de purificar la mezcla de reacción por cromatografía en columna *flash*, se obtuvieron los BODIPYs 1 y 2 con un rendimiento del 25 y 12%, respectivamente. Los grupos amino presentes en la estructura de los BODIPYs 1 y 2 fueron los precursores de los borodipirrometenos catiónicos BODIPY 3 y 4. Por lo tanto, mediante una metilación exhaustiva con yoduro de metilo se obtuvieron los BODIPY catiónicos 3 y 4 (Esquema A2) con un rendimiento del 96% y 95%, respectivamente.

La presencia de grupos amino en el fenileno unido en la posición 8 del anillo de diaza-*s*-indaceno, puede modular el carácter anfifílico de los compuestos mediante sustituyentes catiónicos. Esto permite aumentar la solubilidad del BODIPY en el entorno biológico, mejorando tanto la unión como la penetración en las membranas celulares. La principal diferencia entre los BODIPYs catiónicos 3 y 4, es que en el segundo fotosensibilizador la carga positiva se encuentra unida a una cadena alifática móvil, por lo que el centro catiónico está alejado del BODIPY. Así, esta carga tiene una influencia mínima en la densidad electrónica del BODIPY por lo que se mantienen sus propiedades fotofísicas. Además, esta cadena proporciona una mayor movilidad de la carga, lo que podría facilitar la interacción con la envoltura celular de los microorganismos (sección 1.2. del Capítulo I). Otra diferencia importante entre los BODIPYs 3 y 4, es que el primero de ellos está sustituido en las posiciones β por grupos metilo que influyen en la rotación del anillo *meso*-fenilo.⁹



Esquema A2. Síntesis de los BODIPYs 1-4.

Propiedades espectroscópicas de absorción y de emisión de fluorescencia. Los espectros de absorción de los BODIPYs 3 y 4, en diferentes solventes y en micelas inversas de AOT, se muestran en la Figura A1. La banda de absorción principal de ambos compuestos se encuentra a ~500 nm la cual corresponde a la transición al primer estado excitado (S_0-S_1). Además, presenta un hombro en torno a los 475 nm el cual se asigna a la banda vibracional 0-1 de la misma transición.¹⁰ En el BODIPY 4 se observó una banda de absorción a ~370 nm, la cual corresponde a la transición S_0-S_2 . Ambos compuestos exhibieron características espectrales típicas del núcleo de BODIPY con altos coeficientes de extinción molar (Tabla A1).

Tabla A1. Parámetros espectroscópicos y rendimientos cuánticos de fluorescencias (Φ_F) de BODIPYs.

Parámetros	Medio	BODIPY 3	BODIPY 4
$\lambda_{\max}^{\text{abs}}$ (nm)	DMF	502	498
ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	DMF	85000	95000
$\lambda_{\max}^{\text{emi}}$ (nm)	DMF	513	512
Φ_F^a	DMF	0,29±0,02	0,03±0,02

a. Referencia: fluoresceína, $\Phi_A=0,90$ (H_2O , pH=12).

Se obtuvieron bandas de absorción agudas para ambos compuestos en metanol, DMF y cloroformo, lo que indica que los fotosensibilizadores se encuentran principalmente como monómeros en estos solventes (Figura A1). Se observó un pequeño corrimiento hipsocrómico (5 nm y 8 nm para los BODIPYs 3 y 4 respectivamente) en disolventes más polares con respecto a los no polares (comparar por ejemplo los espectros en metanol y tolueno). Como se observa en la Figura A1, ambos BODIPYs a una concentración de 3,4 μM se disuelven en agua mostrando la banda de absorción característica a ~500 nm. Por otro lado, el BODIPY 4 es poco soluble en *n*-heptano, posiblemente debido a la polaridad del grupo amino en la cadena alifática. Este resultado motivó el ensayo de solubilización de estos BODIPYs catiónicos en micelas inversas de *n*-heptano/AOT (0,1 M)/agua ($W_0=10$). Dependiendo de su polaridad, un fotosensibilizador puede ubicarse en el solvente orgánico, en el agua o en la interfaz micelar de AOT. Cuando los espectros de absorción del BODIPY 3 se estudiaron en la micela, se observó un aumento en la intensidad y un pequeño efecto hipsocrómico de 4 nm en el máximo de la banda con respecto a *n*-heptano. Además, la

absorbancia del BODIPY 4 aumentó considerablemente en la micela con respecto al solvente no polar. Por lo tanto, dado que el espectro de los BODIPYs en el sistema microheterogéneo, es similar al obtenido en DMF, se concluye que ambas moléculas se disolvieron principalmente como monómeros en dicho sistema.

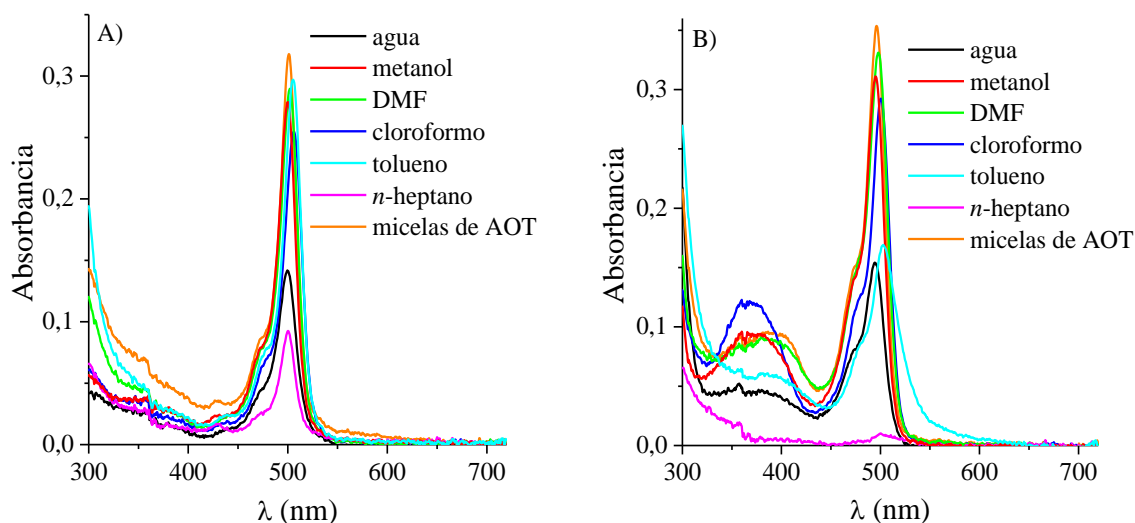


Figura A1. Espectros de absorción de UV-visible de los BODIPYs 3 (A) y 4 (B) en diferentes medios.

Los espectros de emisión de fluorescencia de los BODIPYs se compararon en DMF (Figura A2). Las bandas alrededor de 512 nm son características de esta familia de compuestos y han sido asignadas a la banda vibracional 0-0 de las transiciones S_1-S_0 . A partir de la diferencia entre las longitudes de onda de la banda máxima de los espectros de absorción y de emisión de la transición electrónica 0-0, se calcularon los desplazamientos de Stokes. Estos resultaron ser de 11 y 14 nm para los BODIPYs 3 y 4, respectivamente. Los espectros de absorción y emisión son imágenes especulares entre sí, lo que indica que las especies emisoras y absorbentes son similares. Los pequeños corrimientos de Stokes indican que en estas moléculas las energías espectroscópicas son parecidas a las energías de relajación desde el estado excitado singlete de más baja energía S_1 , lo cual está de acuerdo con la estructura plana y rígida de los BODIPYs.

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) se calcularon en DMF (Tabla A1). El valor de Φ_F para el BODIPY 3 concuerda con lo informado anteriormente para moléculas similares. Este valor es apropiado para la cuantificación de fotosensibilizadores por técnicas de emisión de fluorescencia en medios biológicos. Por el contrario, el BODIPY 4 mostró una emisión de fluorescencia muy débil. Resultados similares se encontraron para otros compuestos con anterioridad.¹¹ La baja fluorescencia se asignó a la rotación libre del

sustituyente en posición *meso*. La β -sustitución en el BODIPY 3 evita la rotación libre del grupo *meso*-fenilo y reduce la desactivación del estado excitado por procesos no radiativos. En cambio, el rendimiento cuántico de fluorescencia es un orden de magnitud más bajo para el BODIPY 4 debido a la rápida rotación del anillo de *meso*-fenilo en la molécula no impedida lo que favorece la conversión interna no radiativa.

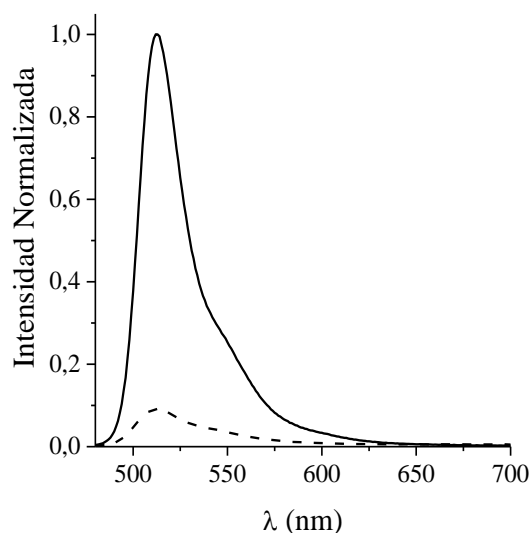
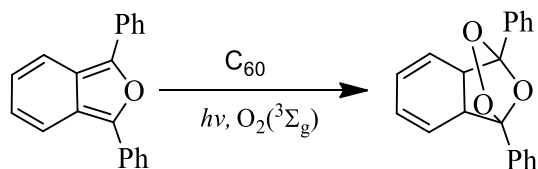


Figura A2. Espectros de emisión de fluorescencia del BODIPY 3 (línea continua) y 4 (línea discontinua) en DMF.

Fotodescomposición de DPBF. La fotooxidación de DPBF inducida por los BODIPYs se estudió en DMF. Este sustrato reacciona con el $O_2(^1\Delta_g)$ para producir 1,2-dibenzoilbenceno (Esquema A3).¹² Por lo tanto, se usó para evaluar la capacidad de los BODIPYs para producir $O_2(^1\Delta_g)$. Así, se siguió el descenso en la absorbancia de DPBF a 413 nm en función del tiempo de irradiación. A partir de las gráficas cinéticas de *pseudo* primer orden, se calcularon los valores de la constante de velocidad observada (k_{obs}) para DPBF con respecto a cada uno de los BODIPYs (Figura A3).



Esquema A386. Reacción de DPBF con $O_2(^1\Delta_g)$.

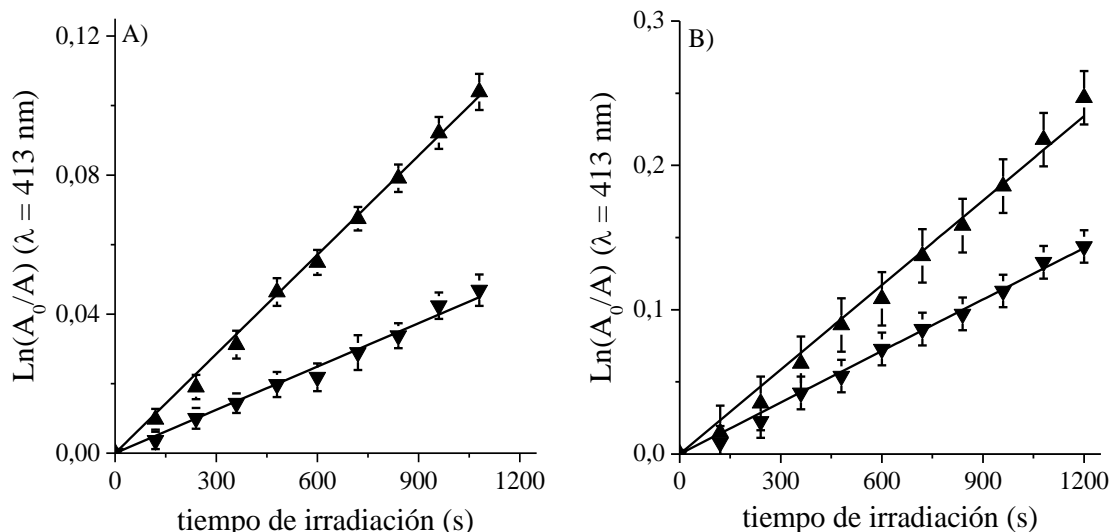


Figura A3. Gráfico de *pseudo* primer orden para la fotooxidación de DPBF (20 mM) fotosensibilizada por BODIPY 3 (▲) y 4 (▼) en DMF (A) y en heptano/AOT (0,1M)/agua ($W_0=10$) (B). $[FS]=10 \mu M$. $\lambda_{irr}=500\pm 5$ nm.

Los resultados se muestran en la Tabla A2. Los valores de Φ_{Δ} se calcularon comparando las pendientes obtenidas para los BODIPYs 3 y 4 con la correspondiente para la referencia, el fullereno C_{60} . Se encontró que los borodipirrometenos descomponen al DPBF en menor medida que el C_{60} , lo que indica que los BODIPYs no producen $O_2(^1\Delta_g)$ de manera eficiente en este medio.

Tabla A2. Parámetros cinéticos para la reacción de fotooxidación de DPBF (k_{obs}^{DPBF}) y Trp (k_{obs}^{Trp}). Rendimientos cuánticos de oxígeno molecular singlete (Φ_{Δ}).

Parámetros	Medio	BODIPY3	BODIPY4
$k_{obs}^{DPBF} (s^{-1})$	DMF	$(9,51\pm 0,04)\times 10^{-5}$	$(4,15\pm 0,05)\times 10^{-5}$
Φ_{Δ}^a	DMF	$0,07\pm 0,04$	$0,03\pm 0,03$
$k_{obs}^{DPBF} (s^{-1})$	AOT ^b	$(1,95\pm 0,03)\times 10^{-4}$	$(1,25\pm 0,02)\times 10^{-4}$
$k_{obs}^{Trp} (s^{-1})$	DMF	$(3,06\pm 0,04)\times 10^{-4}$	$(3,44\pm 0,05)\times 10^{-4}$
	DMF/5% H ₂ O	$(4,75\pm 0,07)\times 10^{-5}$	$(7,86\pm 0,07)\times 10^{-5}$

a. Referencia: C_{60} ; $k_{obs}^{DPBF} (s^{-1}) = (1,44\pm 0,03)\times 10^{-3}$; $\Phi_{\Delta}=1$.

b. Heptano/AOT(0,1M)/agua ($W_0=10$).

La fotooxidación de DPBF mediada por los BODIPYs 3 y 4 se investigó en micelas inversas de *n*-heptano/AOT (0,1 M)/agua ($W_0=10$) bajo condiciones aeróbicas (Figura A3B). La fotodescomposición de DPBF producida por $O_2(^1\Delta_g)$, tiene lugar en la *pseudo* fase

orgánica donde esta molécula no polar se solubiliza principalmente. Como se muestra en la Tabla A2, se encontró una mayor velocidad de reacción de fotooxidación en micelas inversas de AOT que en DMF. En general, la fotooxidación de los sustratos por $O_2(^1\Delta_g)$ en medios microheterogéneos es más lenta debido al reparto del $O_2(^1\Delta_g)$ entre las *pseudo* fases internas y externas.¹¹ Sin embargo, estos BODIPYs pueden interactuar con el AOT a través de sus sustituyentes catiónicos. Estos compuestos pueden ubicarse en la interfaz micelar debido a su carácter anfifílico. Así, su localización en dicha interfaz disminuye la desactivación del estado excitado singlete por una conversión interna no radiativa, favoreciendo así la producción de $O_2(^1\Delta_g)$.

Fotooxidación de L-triptófano. La descomposición fotosensibilizada de Trp producida por los BODIPYs 3 y 4 se investigó en DMF. Como se muestra en la Figura A4, la fotooxidación siguió una cinética de *pseudo* primer orden con respecto a la concentración de Trp. A partir de estos gráficos, se determinaron los valores de k_{obs} para la descomposición del aminoácido. Los resultados se resumen en la Tabla A2.

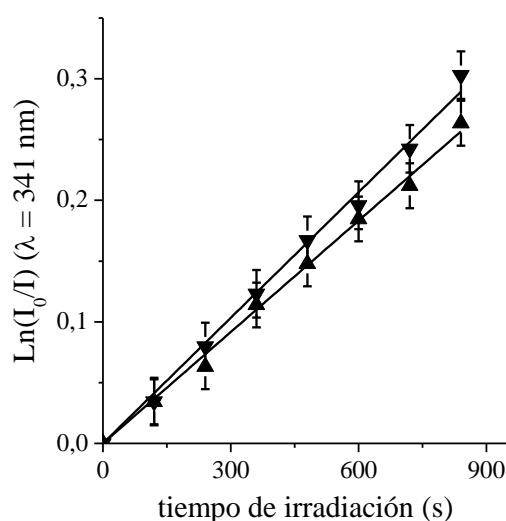


Figura A4. Gráfico de *pseudo* primer orden para la fotooxidación de Trp (20 mM) fotosensibilizada por los BODIPYs 3 (▲) y 4 (▼) en DMF. [FS]=10 μ M. λ_{irr} =500 \pm 5 nm.

Como se puede observar, la fotooxidación del Trp usando estos BODIPYs como fotosensibilizadores fue muy eficiente. En contraste con lo observado con DPBF, se encontró una tasa de reacción más alta para el BODIPY 4 que para el 3. Se sabe que el Trp puede ser fotooxidado por los mecanismos de fotorreacción tipo I y tipo II.¹³ Por lo tanto, podría existir un aporte significativo del proceso tipo I en esta reacción. A partir de los resultados cinéticos

hallados con Trp y DPBF en DMF, llevados a cabo en las mismas condiciones de reacción, se calculó la relación $k_{obs}^{Trp}/k_{obs}^{DPBF}$. Se encontraron valores de 3,2 y 8,3 para los BODIPY 3 y 4, respectivamente. Por otro lado, teniendo en cuenta la constante de velocidad de segundo orden para la reacción entre Trp o DPBF con $O_2(^1\Delta_g)$ se calculó la relación de k_r^{Trp}/k_r^{DPBF} . Se encontró un valor de $\sim 0,07$ que es considerablemente menor a los hallados con otros BODIPYs.¹⁴ Por lo tanto, el fotoproceso tipo I también está contribuyendo a la fotooxidación del Trp en DMF.

Efecto de KI en la emisión de fluorescencia. El efecto que produce el agregado de KI en el espectro de emisión de fluorescencia de los BODIPYs 3 y 4, se investigó en DMF con un 10% de agua. Los valores de Φ_F se calcularon con el agregado de diferentes concentraciones de KI (Tabla A3).

Tabla A3. Rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) de BODIPYs a diferentes concentraciones de KI.

Medio	Φ_F (BODIPY 3)	Φ_F (BODIPY 4)
DMF	0,29±0,02	0,030±0,001
DMF/[KI]=10 mM	0,25±0,01	0,029±0,001
DMF/[KI]=25 mM	0,18±0,01	0,026±0,001
DMF/[KI]=50 mM	0,13±0,02	0,024±0,001

La emisión de fluorescencia de los BODIPYs disminuyó con el aumento en la concentración de la sal inorgánica. Esto se debe a que, el KI aumenta la velocidad de entrecruzamiento de sistemas mediante un efecto de átomo pesado externo.¹⁵ Este resultado se evidencia en el diagrama de Stern-Volmer que se muestra en la Figura A5. Las pendientes de dicho gráfico corresponden a la constante de desactivación del estado excitado (K_{SV}). Los valores de Φ_F obtenidos para diferentes [KI], se resumen en la Tabla A4. Se obtuvo un valor de K_{SV} más alto para BODIPY 3 que 4.

Tabla A4. Constantes de Stern-Volmer y k_q estimada para cada BODIPY.

Molécula	K_{SV} (M ⁻¹)	τ_0 (ns)	k_q (M ⁻¹ s ⁻¹)
BODIPY 3	51,8±0,2	3,90	1,33x10 ¹⁰
BODIPY 4	13,0±0,4	0,36	3,61 x10 ¹⁰

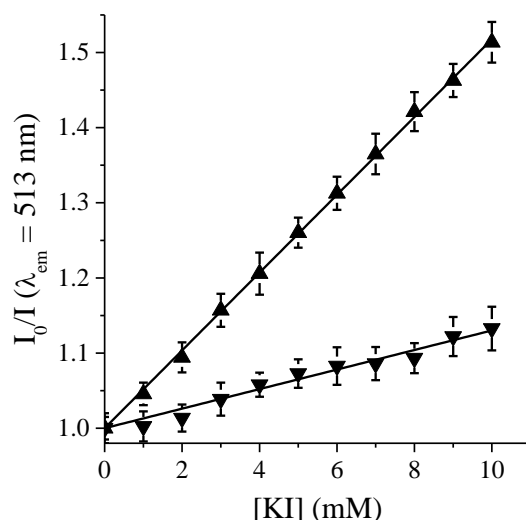


Figura A5. Variación de la intensidad de emisión de fluorescencia en función de la [KI] en DMF para los BODIPYS 3 ($\lambda_{\text{emi}} = 513 \text{ nm}$) (\blacktriangle) y 4 ($\lambda_{\text{emi}} = 512 \text{ nm}$) (\blacktriangledown), $\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$.

Efecto de KI en la fotooxidación de DPBF y L-triptófano. La fotooxidación de DPBF sensibilizada por los BODIPYs 3 y 4, se investigó variando la concentración de KI. Los estudios se llevaron a cabo en una solución de DMF con un 5% de agua. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla A5. Los valores de k_{obs} indican mayor reacción en ausencia de KI. Para ambos BODIPYs, la velocidad de reacción disminuyó en presencia de la sal. El efecto del agregado de I^- fue más pronunciado para la reacción sensibilizada por el BODIPY 4. En presencia de 50 mM de KI, el valor de k_{obs} disminuyó en un factor de 1,8 para el BODIPY 3 y 9,0 para el 4.

Considerando el incremento en el entrecruzamiento de sistemas por la presencia de KI por efecto de átomo pesado externo descrito previamente, se esperaría un aumento en la producción de $\text{O}_2(^1\Delta_g)$. Contrariamente, se observó una disminución de tal producción que depende de la concentración de la sal inorgánica. Por lo tanto, estaría ocurriendo una reacción de desactivación del $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ por parte del I^- generado. Además, esta sal inorgánica mejora la tasa de descomposición del triplete por una desactivación de carga acoplada. Estudios previos, indican que esta reacción ocurre posiblemente, por medio de una transferencia electrónica entre el anión I^- y $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ dando como resultado la producción de tri-yoduro (I_3^-). En este proceso, se forma peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que puede reaccionar con los aniones yoduro para generar I_3^- .¹⁶

Tabla A5. Parámetros cinéticos para las reacciones de fotooxidación de DPBF (k_{obs}^{DPBF}) y Trp (k_{obs}^{Trp}) en presencia de diferentes agregados de KI.

Parámetros	Medio	Agregado	BODIPY 3	BODIPY 4
k_{obs}^{DPBF} (s^{-1})	DMF/5% agua	-	$(1,80 \pm 0,03) \times 10^{-4}$	$(5,81 \pm 0,04) \times 10^{-5}$
	DMF/5% agua	10 mM KI	$(1,58 \pm 0,02) \times 10^{-4}$	$(2,79 \pm 0,03) \times 10^{-5}$
	DMF/5% agua	50 mM KI	$(1,02 \pm 0,01) \times 10^{-4}$	$(0,64 \pm 0,05) \times 10^{-5}$
k_{obs}^{Trp} (s^{-1})	DMF/10% agua	-	$(2,13 \pm 0,03) \times 10^{-5}$	$(2,79 \pm 0,04) \times 10^{-5}$
	DMF/10% agua	50 mM KI	$(4,42 \pm 0,06) \times 10^{-5}$	$(9,55 \pm 0,05) \times 10^{-5}$

Cuando se estudió la fotooxidación de Trp variando la concentración de KI en DMF con un 5% de agua, se obtuvo un valor de k_{obs} mayor para la reacción fotosensibilizada por el BODIPY 4 (Tabla A5). El valor de k_{obs} disminuyó al aumentar la cantidad de agua en el medio. Sin embargo, la adición de 50 mM de KI, produjo un aumento en las velocidades de reacción de descomposición del Trp. Este incremento en la oxidación del sustrato, puede ser consecuencia del aumento en la generación de $O_2^{\bullet-}$ y en la formación de especies radicales de yodo que también pueden estar descomponiendo al Trp. El efecto de KI fue mayor para el BODIPY 4, aumentando en más de tres veces la velocidad de la reacción.

Generación de especies de yodo. Se estudió la generación de especies reactivas de yodo por parte de ambos BODIPYs. El seguimiento de estas especies, se realizó a partir de los espectros de absorción obtenidos luego de la irradiación con luz visible de la solución de BODIPY con KI, a diferentes tiempos (5, 10, 15 y 30 min). Como control positivo, se utilizó el espectro de absorción correspondiente al I_3^- , generado a partir de una solución de Lugol (sol. acuosa de $I_2 + I^-$). La formación de especies de yodo se evaluó siguiendo la aparición del pico a 360 nm característico del ion I_3^- .¹⁷ Como control positivo se emplearon soluciones de Lugol diluidas. Como se muestra en la Figura A6, se producen especies de yodo cuando las muestras son irradiadas durante diferentes tiempos. Por el contrario, no se evidenció la aparición del pico del I_3^- cuando las soluciones se irradiaron durante 30 min sin el fotosensibilizador. Las soluciones con los BODIPYs 3 ó 4 más el KI, también se iluminaron durante 30 min pero bajo una atmósfera de argón. Sin embargo, en estas condiciones no se observó cambios en los espectros de absorción, lo que estaría indicando que el anión tri-yoduro se estaría formando a partir del $O_2(^1\Delta_g)$ generado.

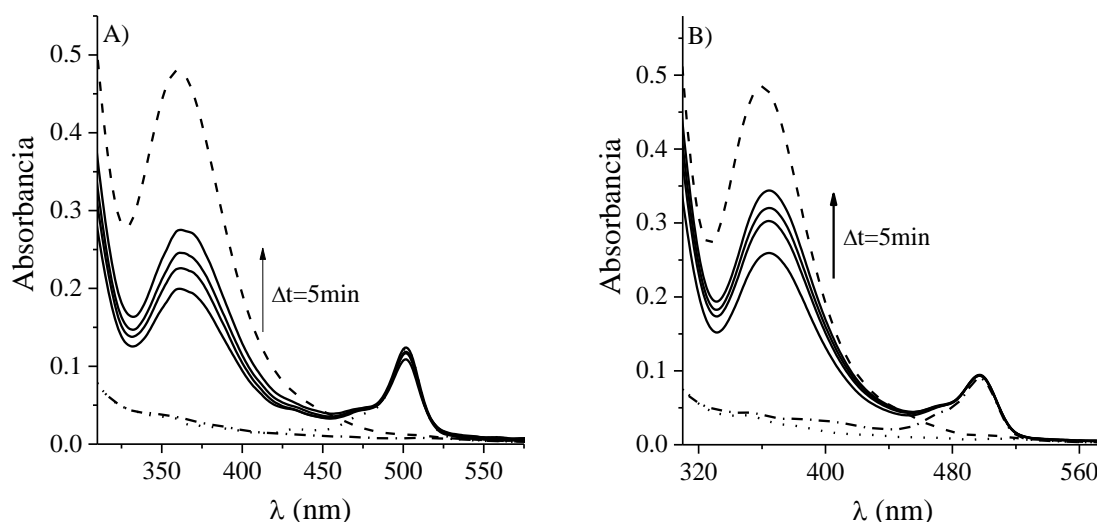


Figura A6. Espectros de absorción con el BODIPY 3 (A) (1 μM) y el 4 (B) (1 μM) en DMF y 10 mM KI registrados antes (línea de puntos), y luego de la irradiación con luz visible a diferentes tiempos (5, 10, 15 y 30 min, línea continua). Como control positivo se utilizó el espectro obtenido de una solución de yodo (20 μM, línea discontinua).

En este sistema, los átomos inestables de yodo (I^{\bullet}) y los aniones radicales de yodo ($I_2^{\bullet-}$) también pueden generarse por la interacción de I^- con HO^{\bullet} .⁴² El I^{\bullet} generado se supone que reacciona con I^- para producir $I_2^{\bullet-}$. Dos $I_2^{\bullet-}$ pueden reaccionar para formar I_3^- y I^- por desproporción.¹⁸ Se propuso que la interacción de los ROS con el KI durante la exposición a la luz, da lugar a yodo molecular biocida (I_2) o a la formación de I_3^- mejorando la inactivación bacteriana.

Localización celular de los BODIPYs. La localización celular de los BODIPYs en las células microbianas se investigó mediante microscopía de fluorescencia. Las imágenes muestran que las células de *S. aureus* y *E. coli* incubadas con los fotosensibilizadores en concentración de 5 μM exhiben la fluorescencia verde típica de los BODIPYs (Figura A7). Este resultado muestra que los borodipirrometenos tienen afinidad por las células microbianas. En solución, el valor Φ_F del BODIPY 4 es aproximadamente un orden de magnitud menor que el de BODIPY 3, lo cual se atribuye a la libre rotación del grupo *meso*-fenilo. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia de ambos BODIPYs unidos a las células es de una intensidad muy similar. Este comportamiento se puede deber a la reducción en la rotación del sustituyente en posición *meso* debido al ambiente más viscoso que rodea a la célula microbiana.¹⁹

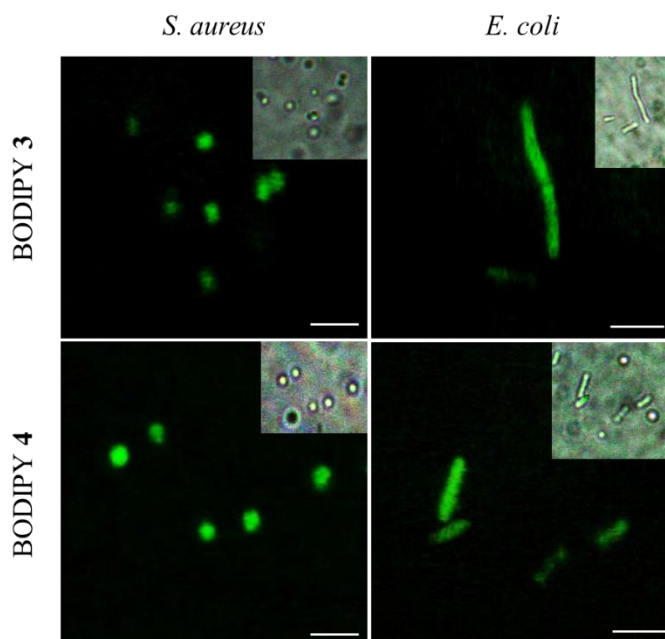


Figura A7. Imágen de microscopía de fluorescencia de *S. aureus* y *E. coli* incubadas con los BODIPY 3 ó 4 en concentración de 5 μM durante 30 min a 37 $^{\circ}\text{C}$ en la oscuridad. Recuadro: Células debajo de un campo brillante (objetivo del microscopio 100x, barra de escala 2 μm).

PDI de bacterias. La PDI de *S. aureus* y *E. coli* inducida por los BODIPYs 3 y 4, se investigó empleando diferentes concentraciones de los fotosensibilizadores y tiempos de irradiación. Las curvas de supervivencia celular se resumen en la Figura A8.

No se encontró toxicidad para las células tratadas con los BODIPY luego de 30 min de incubación en la oscuridad (resultados no mostrados). Además, la viabilidad de las células microbianas no se vio afectada por la irradiación sin fotosensibilizador (Figura A8). *S. aureus* fue la cepa más susceptible a la PDI (Figura A8A). A todos los tiempos de irradiación, la supervivencia se redujo significativamente en comparación con el control. Luego de 5 min de irradiación, ambos BODIPYs produjeron una disminución de 4,5 log en la viabilidad celular de *S. aureus*. Además, se logró la erradicación completa de dicha bacteria después de 15 min de iluminación. El BODIPY 3 produjo una fotoactivación de *S. aureus* similar a la encontrada para el BODIPY 4. Con *E. coli*, la efectividad de la PDI mediada por los BODIPYs 3 y 4 fue muy similar (Figura A8B). Después de 5 min de irradiación, se observó una reducción en el número de células vivas de 1,5 log, mientras que luego de 15 min se obtuvo una disminución de 2,5 log. Sólo cuando el sistema se irradió durante 30 min se obtuvo una disminución en la viabilidad celular de 4,5 log. De estos resultados, se puede deducir que las diferencias estructurales entre los BODIPYs 3 y 4 no influyeron en la PDI de las células bacterianas. Ambas moléculas fueron igualmente eficientes, mostrando un

aumento de su actividad con el incremento en el tiempo de irradiación. Los resultados con la bacteria Gram negativa eran de esperar dada que la naturaleza de la envoltura de las células de *E. coli* (sección 1.2. del Capítulo I).

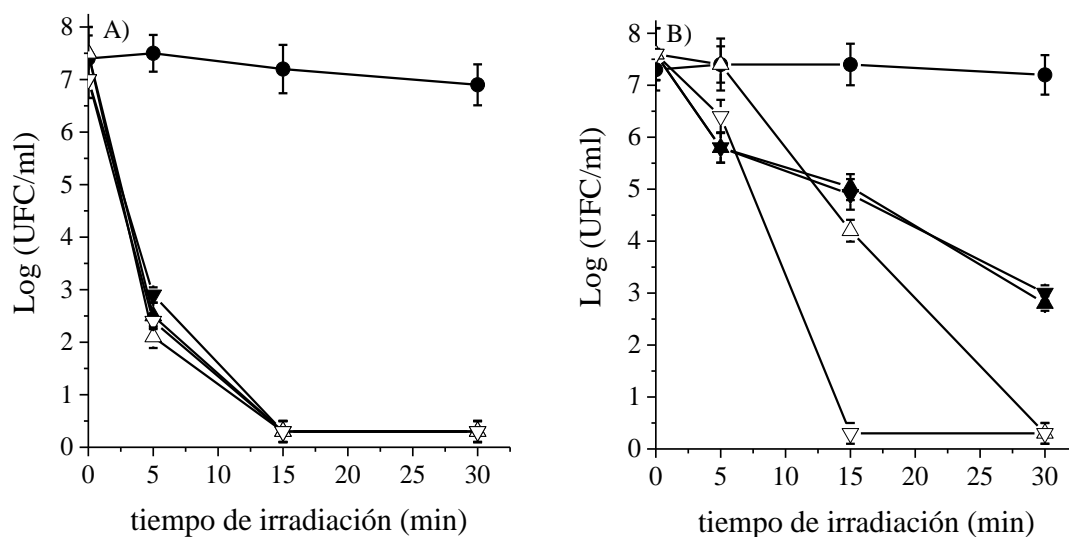


Figura A8. Curvas de supervivencia de (A) *S. aureus* ($\sim 10^7$ UFC/ml) tratadas con los fotosensibilizadores en concentración de 1 μ M, (B) *E. coli* ($\sim 10^7$ UFC/ml) tratadas con los fotosensibilizadores en concentración de 5 μ M e irradiados con luz visible durante diferentes períodos de tiempo. Efecto del BODIPY 3 en ausencia (▲) y en presencia (△) de 50 mM de KI y del BODIPY 4 en ausencia (▼) y en presencia (▽) de 50 mM de KI. Cultivo de control irradiado sin fotosensibilizador (●); cultivo de control irradiado tratado con KI 50 mM sin fotosensibilizador (○).

Efecto de KI en la PDI de microorganismos. La destrucción de células microbianas mediada por BODIPYs se evaluó en presencia de KI después de diferentes períodos de irradiación. Los resultados se muestran en la Figura A8. La adición de KI en concentración de 50 mM no resultó tóxica para los microorganismos en la oscuridad durante 30 min de incubación (resultados no mostrados). Además, no se observó toxicidad para las células microbianas incubadas con KI (50 mM) e irradiadas durante 30 min en ausencia de los BODIPYs (Figura A8). La PDI de *S. aureus* llevada a cabo con la adición de KI, produjo un ligero aumento en la fotoinactivación después de 5 min de irradiación. Sin embargo, el efecto de KI no fue significativo a largos tiempos de irradiación. Esto se debe a que ambos BODIPYs ya son efectivos sin la adición de la sal inorgánica (Figura A8). Los estudios con *E. coli* muestran dos comportamientos diferentes con el agregado de KI (Figura A8). Después de 5 min de irradiación, la fotoinactivación disminuyó en presencia KI (50 mM). Sin embargo, se observó una potenciación en la PDI de *E. coli* para tiempos de irradiación más largos (15 y 30 min). Después de 15 min de iluminación, la adición de KI produjo un aumento en la inactivación en 1 y 4 log para los BODIPYs 3 y 4, respectivamente. Además, se logró una

erradicación total de las células de *E. coli* después de 30 min de irradiación en presencia de KI. Bajo esta última condición, ambos BODIPY produjeron una disminución en la viabilidad celular superior a 7 log. De los resultados obtenidos con *E. coli* se deduce que el BODIPY 4 es significativamente más efectivo que el 3 para tratamientos a tiempos largos. Este efecto solo se observó a la concentración más alta de KI utilizada. Aparentemente, el BODIPY 4 puede confinarse en un microambiente celular que le permite aumentar la actividad fotodinámica potenciada por la presencia de KI. Así, mediante la adición externa de átomos pesados, es posible utilizar estos compuestos en forma dual, como fotosensibilizadores y también como fluoróforos para la obtención de imágenes celulares.

CONCLUSIONES

Los BODIPYs 3 y 4 mostraron similares propiedades espectroscópicas de absorción. Sin embargo, se encontró una emisión de fluorescencia considerablemente más baja para el compuesto 4 que para el 3, lo cual se debe a la libre rotación del anillo de fenileno que promueve la desactivación no radiativa del estado excitado singlete del BODIPY 4.

Los BODIPYs catiónicos mostraron una baja producción de $O_2(^1\Delta_g)$ y una eficiente fotooxidación del aminoácido Trp. Este resultado posiblemente se deba a una contribución del fotoproceso tipo I. La adición de KI a la solución de los fotosensibilizadores, produjo un aumento en la descomposición fotoinducida de Trp. Las especies de yodo reactivo se pueden formar mediante la reacción entre yoduro y las ROS y contribuir así a la descomposición del Trp.

La actividad fotodinámica de los BODIPYs catiónicos 3 y 4, se investigó *in vitro* con células de *S. aureus* y *E. coli*. Estudios de microscopía de fluorescencia revelaron que estos BODIPYs tiñen de manera eficiente las células de las bacterias. Ambos compuestos fueron efectivos para la erradicación de *S. aureus* utilizando una baja concentración del fotosensibilizador y un corto período de irradiación. Con *E. coli* se encontró un efecto fotocitotóxico similar para ambos BODIPY aunque este microbio fue más difícil de erradicar. La adición de KI aumentó significativamente el efecto de la PDI debido tanto a un efecto de átomo pesado externo, como a la formación de especies reactivas de yodo.

En función de los estudios realizados, estos BODIPYs podrían ser empleados como sondas fluorescentes para la detección de células microbianas y luego del agregado de KI, ser utilizados para la PDI de bacterias Gram negativas y positivas.

REFERENCIAS

1. Loudet, A.; Burgess, K. BODIPY dyes and their derivatives: syntheses and spectroscopic properties. *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 4891-4932.
2. Kamkaew, A.; Lim, S. H.; Lee, H. B.; Kiew, L. V.; Chung, L. Y.; Burgess, K. BODIPY dyes in photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 77-88.
3. Boens, N.; Leen, V.; Dehaen, W. Fluorescent indicators based on BODIPY. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 1130-1172.
4. Caruso, E.; Banfi, S.; Barbieri, P.; Leva, B.; Orlandi, V. T. Synthesis and antibacterial activity of novel cationic BODIPY photosensitizers. *J. Photochem. Photobiol. B*, **2012**, *114*, 44-51.
5. Orlandi, V. T.; Rybtke, M.; Caruso, E.; Banfi, S.; Tolker-Nielsen, T.; Barbieri, P. Antimicrobial and anti-biofilm effect of a novel BODIPY photosensitizer against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Biofouling*, **2014**, *30*, 883-891.
6. Rice, D. R.; Gan, H.; Smith, B. D. Bacterial imaging and photodynamic inactivation using zinc(II)-dipicolylamine BODIPY conjugates. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2015**, *14*(7), 1271-1281.
7. Kee, H. L.; Kirmaier, C.; Yu, L.; Thamyongkit, P.; Youngblood, W. J.; Calder, M. E.; Ramos, L.; Noll, B. C.; Bocian, D. F.; Scheidt, W. R.; Birge, R. R.; Lindsey, J. S.; Holten, D. Structural control of the photodynamics of boron-dipyrroin complexes. *J. Phy. Chem. B*, **2005**, *109*, 20433-20443.
8. Rezende, L. C. D.; Emery, F. S. A review of the synthetic strategies for the development of BODIPY dyes for conjugation with proteins, *Orbital Elec. J. Chem.*, **2013**, *5*, 62-83.
9. Harriman, A.; Mallon, L. J.; Ulrich, G.; Ziessel, R. Rapid intersystem crossing in closely-spaced but orthogonal molecular dyads, *Chem. Phys. Chem.*, **2007**, *8*, 1207-1214.
10. Baruah, M.; Qin, W.; Flors, C.; Hofkens, J.; Vallee, R. A. L.; Beljonne, D.; Van der Auweraer, M.; De Borggraeve, W. M.; Boens, N. Solvent and pH dependent fluorescent properties of a dimethylaminostyryl borondipyrromethene dye in solution, *J. Phys. Chem. A*, **2006**, *110*, 5998-6009.
11. Hedley, G. J.; Ruseckas, A.; Harriman, A.; Samuel, D. W. Conformational effects on the dynamics of internal conversion in boron dipyrromethene dyes in solution, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 6634-6637.
12. Agazzi, M. L.; Spesia, M. B.; Gsponer, N. S.; Milanesio, M. E.; Durantini, E. N. Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of a fulleropyrrolidine

bearing a basic amino group and its dicationic analog against *Staphylococcus aureus*, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, **2015**, *310*, 171-179.

13. Ehrenshaft, M.; Deterding, L. J.; Mason, R. P. Tripping up Trp: modification of protein tryptophan residues by reactive oxygen species, modes of detection, and biological consequences, *Free Radic. Biol. Med.*, **2015**, *89*, 220-228.

14. Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution an expanded and revised compilation, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **1995**, *24*, 663-1021.

15. Chmyrov, A.; Sanden, T.; Widengren, J. Iodide as a fluorescence quencher and promoters-mechanisms and possible implications, *J. Phys. Chem. B*, **2010**, *114*, 11282-11291.

16. Felgentrager, A.; Maisch, T.; Spath, A.; Schroderc, J. A.; Baumlera, W. Singlet oxygen generation in porphyrin-doped polymeric surface coating enables antimicrobial effects on *Staphylococcus aureus*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2014**, *16*, 20598-20607.

17. Rowley, J. G.; Farnum, B. H.; Ardo, S.; Meyer, G. J. Iodide chemistry in dye sensitized solar cells: making and breaking I-I bonds for solar energy conversion, *J. Phys. Chem. Lett.*, **2010**, *1*, 3132-3140.

18. Boschloo, G.; Hagfeldt, A. Characteristics of the iodide/triiodide redox mediator in dye-sensitized solar cells, *Acc. Chem. Res.*, **2009**, *42*, 1819-1826.

19. Beney, L.; Gervais, P. Influence of the fluidity of the membrane on the response of the microorganisms to environmental stresses, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2001**, *57*, 34-42.



CAPÍTULO VIII

Producción Científica

CAPÍTULO VIII

8. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

8.1. Publicaciones

- M. B. Ballatore, M. B. Spesia, M. E. Milanesio, E. N. Durantini. Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of porphyrin-fullerene C₆₀ dyads with application in the photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus*. Eur. J. Med. Chem. 2014, 83, 685-694.
- M. B. Ballatore, J. Durantini, N. S. Gsponer, M. B. Suarez, M. Gervaldo, L. Otero, M. B. Spesia, M. E. Milanesio, E. N. Durantini. Photodynamic inactivation of bacteria using novel electrogenerated porphyrin-fullerene C₆₀ polymeric films. Environ. Sci. Technol., 2015, 49(12), 7456-7463.
- M. B. Ballatore, M. L. Agazzi, E. Reynoso, E. D. Quiroga, E. N. Durantini. Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of two cationic BODIPY derivatives with application in the photoinactivation of microorganisms. Eur. J. Med. Chem. 2017, 126, 110-121.
- C. Solis, M. B. Ballatore, M. B. Suarez, M. E. Milanesio, E. N. Durantini, T. Dittrich, M. Santo, L. Otero, M. Gervaldo. Electrochemical generation of a molecular heterojunction. A new Zn-Porphyrin-Fullerene C₆₀ Polymeric Film. Electrochim. Acta. 2017, 238, 81-90.
- E. Reynoso, E. Quiroga, M. Agazzi, M. B. Ballatore, S. Bertolotti, E. N. Durantini. Photodynamic inactivation of microorganisms sensitized by cationic BODIPY derivatives potentiated by potassium iodide. Photochem. Photobiol. Sci. 2017, 16(10), 1524-1536.

8.1.1. Publicaciones en Redacción

- M. B. Ballatore, M. B. Spesia, M. E. Milanesio, E. N. Durantini. Mechanistic studies on the photodynamic effect induced by a porphyrin-fullerene C₆₀ dyads in solution and on *Staphylococcus aureus* cells.
- M. B. Ballatore, E. D. Quiroga, C. Solis, M. Gervaldo, L. Otero, M. E. Milanesio, E. N. Durantini. Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* biofilm using electrogenerated porphyrins and porphyrin-fullerene C₆₀ dyads polymeric films.

- M. B. Ballatore, E. Quiroga, M. E. Milanesio, E. N. Durantini. Synthesis, spectroscopic properties and photodynamic activity of a novel porphyrin-fullerene C₆₀ dyads with application in the photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

8.2. Patente

- M. B. Ballatore, J. E. Durantini, M. B. Spesia, M. E. Milanesio, M. Gervaldo, L. Otero, E. N. Durantini. *Un polímero antibacteriano, un procedimiento de obtención de dicho polímero y dos métodos para inactivar bacterias que comprenden la aplicación de dicho polímero y luz visible. Patente de Invención.* Agente solicitante: Universidad Nacional de Río Cuarto. N° de expediente 20150100405. N° de trámite INPI 15023423. 12 de febrero de 2015.

8.3. Congresos, Simposios, Reuniones y Encuentros

8.3.1. Modalidad Ponencia Oral

- M. B. Ballatore, J. E. Durantini, M. Gervaldo, L. Otero, N. S. Gsponer, M. B. Spesia, M. E. Milanesio y E. N. Durantini. Inactivación fotodinámica de *Staphylococcus aureus* inducida por películas electropoliméricas derivadas de porfirinas y fullereno C₆₀. Tercer Taller Argentino de Ciencias Ambientales (**III TACA**). Ciudad de Córdoba, Argentina, mayo de 2014.

- M. B. Ballatore, M. L. Agazzi, E. D. Quiroga, E. Reynoso, E. N. Durantini. Actividad antibacteriana de BODIPYs catiónicos en presencia de KI. III Reunión de Fotobiólogos Moleculares Argentinos (**III GRAFOB**). San Miguel de Tucumán, Argentina, agosto de 2016.

8.3.2. Modalidad Poster

- M. B. Ballatore, M. E. Milanesio y E. N. Durantini. Funcionalización de fullerenos C₆₀ y síntesis de díadas porfirina-fullereno C₆₀. XVIII Simposio Nacional de Química Orgánica (**XVIII SINAQO**). Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina, noviembre de 2011.

- M. B. Ballatore, M. E. Milanesio y E. N. Durantini. Porphyrin-fullerene C₆₀ dyads as novel sensitizers for photodynamic therapy. XI Encuentro Latinoamericano de Fotoquímica y Fotobiología (**XI ELAFOT**). Ciudad de Córdoba, Argentina, octubre de 2012.

- M. B. Ballatore, M. B. Spesia, M. E. Milanesio y E. N. Durantini. Inactivación fotodinámica de *Staphylococcus aureus* sensibilizada por una díada porfirina-fullereno C₆₀

catiónica. Segunda Reunión de Fotobiólogos Moleculares Argentinos (**II GRAFOB**). Ciudad de Córdoba, Argentina, octubre de 2013.

- M. B. Ballatore, M. E. Milanesio y E. N. Durantini. Síntesis de díadas porfirina-fullereno C₆₀ a partir de porfirinas asimétricas AB₃. XIX Simposio Nacional de Química Orgánica (**XIX SINAQO**). Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, noviembre de 2013.

- M. B. Ballatore, M. B. Spesia, M. E. Milanesio y E. N. Durantini. Mechanistic Studies on the photodynamic activity mediated by a porphyrin-fullerene C₆₀ dyads on *Staphylococcus aureus*. **16th International Congress on Photobiology**. Ciudad de Córdoba, Argentina, septiembre de 2014.

- E. D. Quiroga, E. Reynoso, M. B. Ballatore, M. L. Agazzi, M. G. Álvarez y E. N. Durantini. Borodipirrometenos como agentes fotoinactivantes de microorganismos. **3^{ra} Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina**. San Miguel de Tucumán, Argentina, septiembre de 2015.

- M. B. Ballatore, J. E. Durantini, N. S. Gsponer, M. Gervaldo, L. Otero, M. B. Spesia, M. E. Milanesio y E. N. Durantini. Díada porfirina-fullereno C₆₀ sustituida por grupos carbazol para la inactivación fotodinámica de microorganismos. XX Simposio Nacional de Química Orgánica (**XX SINAQO**). Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, noviembre de 2015.

- M. L. Agazzi, M. B. Ballatore, E. Reynoso, E. D. Quiroga y E. N. Durantini. Efecto de KI en la actividad fotodinámica de BODIPYs catiónicos. XX Simposio Nacional de Química Orgánica (**XX SINAQO**). Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, noviembre de 2015.

- M. B. Ballatore, E. D. Quiroga, C. Solís, M. Gervaldo, L. Otero, M. E. Milanesio, E. N. Durantini. Superficies poliméricas de porfirinas para la fotoinactivación de biofilms. XVI Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurados (**Nano 2016**). Buenos Aires, Argentina, mayo 2016.

- C. Solís, M. Santo, M. B. Ballatore, M. E. Milanesio, E. N. Durantini, Th. Dittrich, L. Otero, M. Gervaldo. Generación de heterouniones fotoactivas por electropolimerización de porfirina y díada porfirina-C₆₀. XVI Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurados (**Nano 2016**). Buenos Aires, Argentina, mayo 2016.

- E. D. Quiroga, M. B. Ballatore, M. G. Álvarez, E. N. Durantini. Fotoinactivación de *Candida albicans* inducida por díadas porfirina-fullereno C₆₀. III Reunión de Fotobiólogos

Moleculares Argentinos (**III GRAFOB**). San Miguel de Tucumán, Argentina, agosto de 2016.

- M. B. Ballatore, E. D. Quiroga, C. Solis, M. Gervaldo, L. Otero, M. E. Milanesio y E. N. Durantini. Películas poliméricas electrogeneradas de porfirinas para fotoinactivar *Staphylococcus aureus*. XX Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica (**XX CAFQI**). Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina, mayo de 2017.

- C. Solis, M. B. Ballatore, M. B. Suarez, M. E. Milanesio, E. N. Durantini, M. Santo, Th. Dittrich, L. Otero y M. Gervaldo. Electrogeneración de películas poliméricas fotoactivas formadas por porfirina y porfirina-C₆₀. XX Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica (**XX CAFQI**). Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina, mayo de 2017.

- E. Reynoso, E. D. Quiroga, M. L. Agazzi, M. B. Ballatore, E. N. Durantini. Potassium iodide enhancer effect on the photodynamic inactivation of microorganisms sensitized by cationic BODIPY derivatives. XIII Encuentro Latinoamericano de Fotoquímica y Fotobiología (**XIII ELAFOT**). Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina, octubre de 2017.

- M. B. Ballatore, M. E. Milanesio y E. N. Durantini. Diseño y síntesis de porfirinas para la inactivación fotodinámica de microorganismos. XXI Simposio Nacional de Química Orgánica (**XXI SINAQO**). Potrero de los Funes, San Luis, Argentina, noviembre de 2017.

8.4. Premios

- Premio **INNOVAR** en la categoría investigación aplicada del Concurso Nacional de Innovaciones entregado por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva por el proyecto 18221-Superficies antimicrobianas activadas por luz visible. San Martín, Buenos Aires, Argentina, octubre de 2015.

- Premio al **mejor trabajo** otorgado por la Sociedad Argentina de Investigación en Química Orgánica (SAIQO). Área: fisicoquímica orgánica. XX Simposio Nacional de Química Orgánica (XX SINAQO). Título del trabajo: Díada porfirina-fullereno C₆₀ sustituida por grupos carbazol para la inactivación fotodinámica de microorganismos. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, noviembre de 2015.

- Premio al **mejor trabajo** otorgado por la Asociación Argentina de Investigación Fisicoquímica (AAIFQ). Sección: fisicoquímica orgánica y fotoquímica: cinética y mecanismos de reacciones, espectroscopias. XX Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica (XXCAFQI). Título del trabajo: Películas poliméricas electrogeneradas

de porfirinas para fotoinactivar *Staphylococcus aureus*. Carlos Paz, Córdoba, Argentina, mayo de 2017.

8.5. Becas de Posgrado

- *Beca CONICET*. Tema: “Estructuras moleculares formadas por porfirinas y fullereno C₆₀ con aplicaciones en la inactivación fotodinámica de microorganismos”. Director: Dr. Edgardo N. Durantini. Co-directora: Dra. M. Elisa Milanesio. Dpto. de Química. FCEFQYN. UNRC. Resolución D N° 2327/12. Abril de 2013-Marzo de 2018.

- *Beca Fulbright*. Título del proyecto: “Synthesis of novel amphiphilic bacteriochlorin with application in the photodynamic inactivation of microorganisms”. Director: Dr. Jonathan S. Lindsey. Dpto. de Química. Universidad Estatal de Carolina del Norte, Raleigh, Estados Unidos. Agosto de 2017-Noviembre 2017.